

CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES MICROBIANAS ASOCIADAS A
DEPÓSITOS DE MINERALES SECUNDARIOS EN TUBOS DE LAVA Y MINAS DE
AGUA



Instituto de
Recursos Naturales
y Agrobiología
de Sevilla



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES MICROBIANAS ASOCIADAS A DEPÓSITOS DE MINERALES SECUNDARIOS EN TUBOS DE LAVA Y MINAS DE AGUA

Memoria que presenta

la Licenciada en Farmacia Ángela María García Sánchez

para optar al título de Doctora en Farmacia

por la Universidad de Sevilla

Sevilla 2016

CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES MICROBIANAS ASOCIADAS A DEPÓSITOS DE MINERALES SECUNDARIOS EN TUBOS DE LAVA Y MINAS DE AGUA

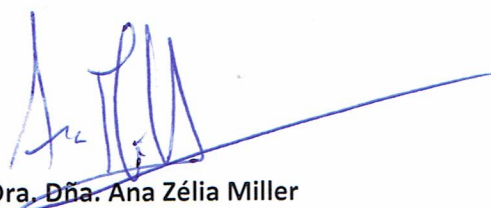
Visado en Sevilla. Mayo de 2016.

LOS DIRECTORES



Dr. D. Cesáreo Sáiz Jiménez

Profesor de Investigación
Instituto de Recursos Naturales y
Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC)



Dra. Dña. Ana Zélia Miller

Doctora Contratada
Instituto de Recursos Naturales y
Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC)



Dra. Dña. Valme Jurado Lobo

Doctora Contratada
Instituto de Recursos Naturales y
Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC)

LA TUTORA



Dra. Dña. Cristina Cutillas Barrios

Catedrática de la Universidad de Sevilla
Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Farmacia

DR. D. CESÁREO SÁIZ JIMÉNEZ, PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, DRA. DÑA. ANA ZÉLIA MILLER, DOCTORA CONTRATADA EN EL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y DRA. DÑA. VALME JURADO LOBO, DOCTORA CONTRATADA EN EL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CERTIFICAN: Que la presente Memoria de Investigación titulada "Caracterización de comunidades microbianas asociadas a depósitos de minerales secundarios en tubos de lava y minas de agua", presentada por la Licenciada en Farmacia ÁNGELA MARÍA GARCÍA SÁNCHEZ para optar al grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Agroquímica, Microbiología Ambiental y Conservación de Suelos, bajo nuestra dirección reuniendo todos los requisitos exigidos.

Y para que conste, se expide y firma el presente certificado

En Sevilla, a 25 de mayo de 2016

Fdo: Dr. D. Cesáreo Sáiz Jiménez

Fdo: Dra. Dña. Ana Zélia Miller


Fdo: Dra. Dña. Valme Jurado Lobo



JOSÉ ENRIQUE FERNÁNDEZ LUQUE, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CERTIFICA: Que la presente Memoria de Investigación titulada “Caracterización de comunidades microbianas asociadas a depósitos de minerales secundarios en tubos de lava y minas de agua”, presentada por la Licenciada en Farmacia ÁNGELA MARÍA GARCÍA SÁNCHEZ para optar al grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Agroquímica, Microbiología Ambiental y Conservación de Suelos, bajo la dirección del Prof. Dr. D. Cesáreo Sáiz Jiménez, la Dra. Ana Zélia Miller y la Dra. Valme Jurado Lobo, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado


En Sevilla, a 25 de mayo de 2016



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar expresando mi agradecimiento al Prof. Dr. Cesáreo Sáiz, por haberme ofrecido la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral, así como a las Dras. Ana Miller y Valme Jurado. Muchas gracias por todos los valiosos consejos y las directrices que me habéis proporcionado para lograr la culminación de este estudio.

A la Dra. Cristina Cutillas Barrios, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, por haber tutorizado el presente trabajo y por su disponibilidad siempre que la he necesitado.

A la financiación recibida por parte de las Ayudas para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (AP2010-2052), gracias a la cual ha sido posible desarrollar este proyecto en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, centro del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Al Dr. Miguel Ángel Caviedes, del que aprendí a apreciar el mundo de la Microbiología y me dio a conocer el grupo de investigación en el que pude realizar la Tesis Doctoral. Gracias por creer en mí desde un principio, por nunca dudar en ayudarme y por las lecciones de vida de valor incalculable.

A la Dra. Concepción Ariza Astolfi, que me dirigió en mis primeros pasos en el mundo de la investigación y que siempre se ha preocupado por mi bienestar.

Al Dr. Manuel Pereira y a la Dra. Amélia Dionísio, del CERENA del Instituto Superior Técnico de la Universidad de Lisboa (IST-UL), por su colaboración en los análisis mineralógicos.

A Octavio Fernández Lorenzo, espeleólogo del G.E. Tebexcorade – La Palma, y a Manuel Naranjo Morales, por la colaboración en los muestreos realizados en las islas de La Palma y Gran Canaria, respectivamente, así como al Dr. Jose María Calaforra y sus colaboradores, por suministrar las muestras de las Islas Galápagos al grupo de Microbiología Ambiental del IRNAS.

A Ana, por su implicación en mi tesis, por la confianza depositada en mí y por haberme prestado siempre ayuda con tanta amabilidad y dedicación.

Al resto de mis compañeros del grupo de Microbiología Ambiental y Patrimonio Cultural del IRNAS, con los que he compartido gran parte de mi vida en estos años: Irene, Marta, Sara, Leonila, Isa, Pedro, Miguel, Bernardo, Alfonso y José Luis.

Gracias también a todos los compañeros del IRNAS que siempre me dedicaron una sonrisa por los pasillos. Muy especialmente a Paloma, cuya amistad ha sido

fundamental y sin la que no habría aprendido que los abrazos auténticos han de durar más de cinco segundos.

Al Dr. Antonio Ventosa y todos los compañeros del Departamento de Microbiología y Parasitología con los que he podido coincidir durante la impartición de docencia, siempre dispuestos a ayudarme y responsables de que haya representado una de las mejores experiencias que he vivido en esta etapa.

A todos mis amigos, especialmente a Julián, Cristina G., Cristina B., Diana, José Manuel, María, Félix, Pablo, David, José Carlos y Néstor, por apoyarme incondicionalmente, regalarme su amistad y demostrarme que por personas como ellas merece la pena afrontar el día a día.

A mi familia, por su infinito cariño y apoyo, así como por su paciencia y la ayuda que me han brindado en todo momento. A mis abuelos y mi tío, que siempre se han desvivido por darme ánimos. A mi padre, gracias al que nunca me ha faltado de nada para poder desarrollar mi carrera. A Loly y Juan Luis, por tratarme como a una hija y por su constante respaldo.

A Daniel, por tu comprensión, apoyo, paciencia y por lograr mi felicidad de mil maneras. Tú conoces mejor que nadie el alcance de todo el esfuerzo y sacrificio tras cada página. Deseo que ésta sea una más de las muchas aventuras juntos que el futuro nos brinde.

A mi madre, a la que dedico este trabajo. Me enseñaste a no rendirme jamás y me inculcaste gran parte de los valores que me han convertido en la persona que soy. Gracias por anteponer mi felicidad a la tuya propia. Eres mi orgullo y ejemplo a seguir. Hemos llegado juntas al final de este camino, como prometimos. Cuento contigo para que sigamos adelante.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Geomicrobiología de ambientes subterráneos	3
1.2 Depósitos de minerales secundarios biogénicos: Bioespeleotemas	6
1.2.1 Depósitos negros, óxidos de manganeso	9
1.2.2 Carbonatos y moonmilk	12
1.2.3 Silicatos y coraloides	16
1.2.4 Mucolitos	17
1.3 Geomicrobiología de cavidades graníticas: Minas de agua	18
1.4 Geomicrobiología de tubos de lava	22
1.5 Implicaciones astrobiológicas	29
1.6 Contexto de la tesis	31
1.7 Objetivos de la tesis	34
1.8 Estrategia de trabajo	34
CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS	37
2.1 Muestras estudiadas	39
2.2 Aislamiento, enriquecimiento y caracterización de cepas bacterianas	40
2.2.1 Medios de cultivo	40
2.2.2 Extracción y cuantificación de ADN genómico de cepas bacterianas	44
2.2.3 Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	44
2.2.4 Análisis e identificación de secuencias de ADN	46
2.3 Caracterización de las comunidades microbianas de las muestras naturales y de los cultivos de enriquecimiento	46
2.3.1 Extracción de ácidos nucleicos	46
2.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	49
2.3.3 Purificación de productos de PCR	50
2.3.4 Electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE)	50
2.3.5 Construcción de genotecas de ADN y ARN	52
2.3.6 Análisis de secuencias: clasificación en OTUs e identificación	54
2.4 Análisis filogenético	55
2.5 Estudios microscópicos y espectroscópicos de los espeleotemas	56
2.5.1 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) y espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS)	56
2.5.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	56
2.5.3 Espectroscopía Micro-Raman	57
2.5.4 Espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR)	57
2.6 Obtención de birnesita sintética	58

2.7 Estudio del gen <i>mofA</i>	59
2.8 Reactivo Leucoberbelin blue-I	60
CAPÍTULO 3. MINA DE AGUA DE PARANHOS (OPORTO, PORTUGAL)	63
3.1 Localización y descripción de la mina de agua de Paranhos	65
3.2 Localización y recogida de muestras	67
3.3 Resultados	68
3.3.1 Muestras de depósitos negros 0212T2A y 0313T2A	68
Bacterias cultivadas	68
Cultivos de enriquecimiento	72
Estudios de las comunidades bacterianas de las muestras naturales de depósitos negros 0212T2A y 0313T2A mediante genotecas de ADN y ARN	87
Reactivo Leucoberbelin blue-I	107
Estudio de las comunidades bacterianas mediante DGGE	108
Estudio del gen <i>mofA</i>	112
Caracterización mineralógica y morfológica	113
3.3.2 Muestras de moonmilk 0710T2-6F	120
Estudio de las comunidades microbianas de la muestra natural de moonmilk 0710T2-6F mediante genotecas de ADN	120
Caracterización mineralógica y morfológica	128
3.4 Discusión	129
3.4.1 Muestras de depósitos negros 0212T2A y 0313T2A	129
Cepas aisladas	129
Influencia de las condiciones ambientales y geoquímicas del túnel de Paranhos en las comunidades microbianas	130
Concordancia entre los datos de las genotecas de los cultivos de enriquecimiento, genotecas de las muestras naturales y las cepas aisladas	131
Biomíneralización relacionada con el Mn y el Fe	133
Birnesita sintética y birnesita biogénica	135
Filamentos reticulados	136
Cambio de color en los cultivos de enriquecimiento en medio Rouf modificado	138
<i>Leptothrix cholodnii</i> LMG 8142	140
Reactivo Leucoberbelin blue-I	140
3.4.2 Muestra de Moonmilk 0710T2-6F	141
Comunidades microbianas y su relación con el posible origen biogénico del moonmilk	141
Composición de las muestras y origen de la posible fuente de calcio	144

CAPÍTULO 4. MINA DE AGUA DAS AVELEIRAS (BRAGA, PORTUGAL)	147
4.1 Localización y descripción de la Mina de agua das Aveleiras	149
4.2 Localización y recogida de muestras	152
4.3 Resultados	154
4.3.1 Estudios de las comunidades bacterianas de la muestra natural de depósitos negros mediante la construcción de una genoteca de ADN	154
4.3.2 Análisis filogenético	161
4.3.3 Caracterización mineralógica y morfológica	163
4.4 Discusión	164
CAPÍTULO 5. TUBOS DE LAVA DE LA PALMA Y GRAN CANARIA (ISLAS CANARIAS, ESPAÑA)	169
5.1 Localización y descripción de los tubos de lava canarios	171
5.1.1 Cueva del Llano de los Caños	171
5.1.2 Mina de los Cernícalos	173
5.2 Localización y recogida de muestras	175
5.3 Resultados	177
5.3.1 Muestra de depósitos orgánicos negros MZ04-1 (La Palma)	177
Bacterias cultivadas	177
Cultivos de enriquecimiento	179
Estudio de las comunidades bacterianas de la muestra natural MZ04-1 mediante la construcción de una genoteca de ADN	183
Caracterización morfológica	191
5.3.2 Muestras de mucolitos MZ04-4 y MZ04-5 (La Palma)	192
Bacterias cultivadas	192
Cultivos de enriquecimiento	194
Estudio de las comunidades bacterianas de las muestras naturales MZ04-4 y MZ04-5 mediante la construcción de genotecas de ARN	200
Caracterización morfológica	209
5.3.3 Muestra de depósitos negros MNGC-1 (Gran Canaria)	210
Bacterias cultivadas	210
Cultivos de enriquecimiento	212
Estudio de las comunidades bacterianas de la muestra natural MNGC-1 mediante la construcción de una genoteca de ADN	215
Caracterización morfológica	223
Estudio del gen <i>mofA</i>	224
5.3.4 Estudio de las comunidades bacterianas mediante DGGE	225
5.4 Discusión	227
5.4.1 Aspectos generales de las muestras de los tubos de lava estudiados	227
5.4.2 Muestra de depósitos negros orgánicos MZ04-1	229
5.4.3 Muestras de mucolitos MZ04-4 y MZ04-5	232

5.4.4 Muestra de depósitos negros de ferromanganeso MNGC-1	234
CAPÍTULO 6. TUBOS DE LAVA DE LAS ISLAS GALÁPAGOS (ECUADOR)	237
6.1 Localización y descripción de los tubos de lava	239
6.2 Localización y recogida de muestras	242
6.3 Resultados	243
6.3.1 Estudio de las comunidades bacterianas de las muestras naturales Bella 1 y Royal 2 mediante la construcción de genotecas de ADN	243
6.3.2 Caracterización morfológica	256
6.4 Discusión	257
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	261
BIBLIOGRAFÍA	265

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 GEOMICROBIOLOGÍA DE AMBIENTES SUBTERRÁNEOS

A lo largo y ancho de nuestro planeta existe una amplia variedad de ambientes subterráneos, entre los que se encuentran distintas clases de cavidades como cuevas, cavernas, simas, minas y túneles. Estos ambientes poseen diferente naturaleza y origen, ya que aunque en su mayoría constituyen cavidades naturales del subsuelo, otras han sido construidas artificialmente mediante la acción del hombre.

El término “cueva” es un concepto amplio y por este motivo su definición está basada en una variedad de criterios, considerando aspectos como su génesis, geología y tamaño (Bögli, 1980), la relación con el entorno (Worboys y col., 1982), e incluso su protección y gestión ambiental (Gillieson, 1996). Por ejemplo, White (1984) propuso una definición estrictamente científica, considerándola como una oquedad en la roca que actúa como conducto de un flujo de agua, que puede ser ocasional o continuo, entre puntos de entrada, como las simas o diversos conductos preferenciales de infiltración, y puntos de salida, como manantiales o goteos.

Desde un punto de vista geomicrobiológico, las cuevas son hábitats con poca disponibilidad de nutrientes y con un amplio abanico de reacciones redox generadas por las interacciones entre las actividades microbianas y los minerales de estos ambientes (Northup y Lavoie, 2001).

Las cuevas en general comparten ciertas características propias y comunes: carecen de luz natural en su interior, mantienen una temperatura estable durante todo el año (similar a la media externa anual), presentan una humedad elevada cercana a la saturación (Engel y col., 2001; Zhou y col., 2007), poseen relativamente poca o ninguna carga de nutrientes orgánicos y también extensas áreas de superficies minerales. Por estos motivos, y a pesar de que suelen poseer condiciones físico-químicas estables (Cigna, 2004), algunas cuevas pueden considerarse ambientes extremos para los microorganismos (Saiz-Jimenez, 2012).

A pesar de tratarse de sistemas oligotróficos (con poca o ninguna materia orgánica disuelta en las aguas de infiltración), pueden existir factores que introduzcan en las cuevas una mayor cantidad de carbono orgánico del ambiente externo (Barton y Jurado, 2007). Por ejemplo, la existencia de un río que discurre por el interior de la cueva, caso de la cueva de Tito Bustillo en Asturias, puede provocar aportes de materia orgánica e inundaciones y que los restos vegetales penetren en la misma con mayor facilidad. La circulación del aire, especialmente intensa en aquellas cuevas con más de una entrada (cueva de los Murciélagos en la provincia de Córdoba), puede introducir esporas y materia particulada. Asimismo, los animales que habitan en ellas, como los murciélagos (Cueva de Ardales, Málaga), o incluso visitantes humanos, en el caso de cuevas turísticas (Nerja, Tesoro, en la provincia de Málaga, Gruta de las Maravillas, en

la de Huelva), introducen carbono orgánico en forma de cabellos, células epiteliales y excrementos.

Simon y col. (2007), propusieron un modelo conceptual que explicaba los intercambios cíclicos de nutrientes entre la superficie y el subsuelo. Estos intercambios también se ven influenciados según si se trata de la zona de entrada de la cueva, la zona crepuscular o la zona de oscuridad (Barton y Northup, 2007). En general, la entrada es el lugar dónde se produce un mayor intercambio de materia entre la superficie y el subsuelo, siendo mucho menor en la zona más profunda de la cavidad.

Las cuevas más comunes son las formadas en caliza y otros tipos de rocas calcáreas en regiones kársticas. Son también las formaciones subterráneas más investigadas y, por tanto, en las que más conocimiento se ha generado (Pla y col., 2015; Saiz-Jimenez y col. 2012; Van y col. 2010). No obstante, existen otras cavidades en el subsuelo, como los tubos de lava y minas de agua, poco exploradas y sobre las que se están llevando a cabo estudios en distintos países.

La colonización de las cuevas por los microorganismos es un proceso natural que se ha observado incluso en aquellas que aún no han sido exploradas o expuestas a las visitas, como la cueva de La Garma en Cantabria (Schabereiter-Gurtner y col., 2004). Aunque algunas cuevas presentan condiciones extremas para el desarrollo de la vida, diversas comunidades microbianas son capaces de crecer en estos ambientes e interactuar con el entorno subterráneo.

En base a estas ideas centrales surge la Geomicrobiología, ciencia que investiga la interacción entre los sustratos geológicos y los microorganismos (Cockell, 2010). Los microorganismos ejercen un control mineralógico y geoquímico significativo en sus inmediaciones, a través de sus capacidades metabólicas y necesidades de crecimiento. Así, dan forma a su entorno geoquímico e influyen en las transformaciones minerales que ocurren en las cuevas. A su vez, las condiciones geoquímicas locales gobiernan determinados procesos metabólicos. Estas influencias mutuas hacen que la evolución microbiana se haya producido en consonancia con las condiciones variables de la geosfera y deja entrever que los microorganismos han impulsado grandes cambios en los océanos y continentes (Druschel y Kappler, 2015).

Los microorganismos que habitan en cuevas son de muy diversos tipos, siendo clasificados como oligotrofos cuando crecen con menos de 2 mg/L de carbono orgánico (Barton y Jurado, 2007). Destacan asimismo aquellos que pueden obtener energía directamente de la oxidación de compuestos inorgánicos reducidos (quimiótrofos). Como resultado de su capacidad distintiva de crecer en medios estrictamente minerales, en ausencia de luz, estos organismos son denominados con frecuencia quimiolitótrofos (del griego “lithos”, roca). La mayoría de los organismos quimiolitótrofos son también autótrofos, es decir, capaces de obtener el carbono de la

fijación del dióxido de carbono, denominándose por tanto quimiolitotófos. También cabe señalar a los microorganismos que obtienen energía de la oxidación de materia orgánica reducida (quimioheterótrofos) (Gabriel y Northup, 2013).

El hecho de que la mayoría de los microorganismos activos en cuevas posean requerimientos de nutrientes específicos, provoca que sean difíciles de cultivar, por lo que el uso de técnicas moleculares ha sido fundamental en el descubrimiento de la biodiversidad de ambientes subterráneos y de los grupos de bacterias que antes eran desconocidos (Saiz-Jimenez, 2012). El estudio de todas las interacciones microbio-mineral forman parte de la Geomicrobiología, debido a que los minerales y las rocas son los materiales terrestres con los que los microorganismos fundamentalmente interactúan en todas las escalas (Dong, 2010). Mediante la combinación de técnicas geoquímicas y microbiológicas, la disciplina de la Geomicrobiología consigue tener un mayor conocimiento sobre cómo las comunidades microbianas influyen en la deposición de espeleotemas (Gabriel y Northup, 2013).

Espeleotema es un término que proviene de las palabras griegas *spelaión* (que significa cueva) y *thema* (que significa depósito). Son las formaciones minerales que decoran las cuevas: los depósitos de minerales secundarios, como las bien conocidas estalactitas y estalagmitas de las cuevas calizas.

Los espeleotemas están compuestos de minerales secundarios, los cuales derivan, mediante una reacción fisicoquímica, de un mineral primario en la roca madre (Moore, 1952). Las reacciones que dan lugar a los minerales secundarios pueden ser de diferente naturaleza (Onac, 2012):

- 1) Disolución/precipitación (calcita, yeso, etc.).
- 2) Reacciones ácido-base homogéneas o heterogéneas (por ejemplo, con el ácido carbónico).
- 3) Transiciones de fase, como la inversión aragonito-calcita.
- 4) Hidratación/deshidratación (por ejemplo, la mirabilita/thenardita).
- 5) Procesos microbianos, como los que influyen en la precipitación de la calcita.
- 6) Reacciones redox, principalmente aquellas que involucran al azufre y al manganeso.

Un aspecto importante a tener en cuenta es que los espeleotemas se clasifican de acuerdo a su morfología, es decir, el aspecto que presentan en la cueva, no tanto respecto a su composición. Esto entraña que la calcita en sí no representa un espeleotema, pero una estalactita de calcita en una cueva sí. Las estalactitas son espeleotemas que pueden estar compuestos por una amplia variedad de minerales, incluyendo el cobre y el hierro, como en las minas abandonadas de la Franja Pirítica Ibérica.

Aunque la calcita es el principal mineral secundario, componente de la mayor parte de los tipos de espeleotemas, Hill y Forti (1997) llegaron a describir 255 minerales, número que sigue aumentando cada vez más, dando a entender que la lista de minerales secundarios aún dista de ser completada (Onac y Forti, 2011a).

1.2 DEPÓSITOS DE MINERALES SECUNDARIOS BIOGÉNICOS: BIOESPELEOTEMAS

La biomineralización es el proceso natural mediante el cual los organismos vivos producen minerales (Bäuerlein, 2004). Esta definición abarca tanto a procariotas como a eucariotas, incluidos los seres humanos. La biomineralización, por tanto, puede producirse tanto en microorganismos como en animales y plantas. Los animales son el grupo capaz de dar lugar a un mayor número de biominerales diferentes, seguidos por las bacterias, las plantas vasculares y, finalmente, los hongos y los protozoos (Simkiss y Wilbur, 1989).

Existen dos modelos mecanísticos que diferencian los procesos de biomineralización en: 1) mineralización controlada biológicamente (Bazylinski y Frankel, 2003); y 2) mineralización inducida biológicamente (Lowenstam, 1981).

En cuanto a la mineralización controlada biológicamente, los minerales se forman generalmente en matrices, vesículas orgánicas o espacios intracelulares análogos delimitados para este propósito. El organismo ejerce un grado de control significativo sobre el proceso de nucleación y crecimiento del mineral y, por lo tanto, sobre la composición, tamaño, hábito, y localización final del mineral (Bazylinski y Frankel, 2003; Mann, 2001). Las partículas de mineral producidas se caracterizan por ser cristales bien ordenados, no amorfos (Miller y col., 2013). Este tipo de biomineralización, más frecuente en los organismos superiores que en los microorganismos, da lugar a minerales con unas funciones muy específicas, como demuestran las conchas, dientes, esqueletos y cáscaras de huevo, entre otros.

Los minerales generados mediante mineralización inducida biológicamente se depositan en el exterior del organismo implicado. Por tanto, al contrario que en el caso anterior, la mineralización ocurre en un ambiente abierto, en el que no existe una maquinaria celular o macromolecular especializada que desempeñe una función concreta en el proceso (Pérez-González y col., 2010). Una característica de este mecanismo es que la mineralogía de la fase sólida resultante depende en gran medida de las condiciones ambientales en las que el organismo implicado se desarrolla, lo cual denota que un mismo organismo en distintas condiciones puede dar lugar a distintos minerales (Lowenstam y Weiner, 1989). Es una manera indirecta de génesis mineral que ocurre como resultado de actividades metabólicas del organismo y posteriores reacciones químicas provocadas por dicho metabolismo. Los biominerales generados mediante mineralización inducida biológicamente suelen tener una distribución de

tamaños de partícula amplia, están poco cristalizados y no presentan una morfología cristalina específica (Miller y col., 2013). Reúnen los criterios para ser considerados verdaderos minerales, pero con frecuencia pueden distinguirse de sus homólogos inorgánicos por su peculiar forma, tamaño, grado de cristalinidad, composición isotópica y de elementos traza (Weiner y Dove, 2003). La mineralización inducida biológicamente es el proceso dominante entre los procariotas, hongos, algunos eucariotas unicelulares y algas. Es especialmente frecuente entre los diversos filos bacterianos, los cuales generan biominerales en todo tipo de ambientes (Pérez-González y col., 2010).

Según Benzerara y col. (2011), los microorganismos pueden influir en la formación de minerales de varias maneras distintas: a) modificando la composición del medio y volviéndolo sobresaturado; b) produciendo polímeros orgánicos, que pueden afectar a la nucleación, favoreciendo o inhibiendo la estabilización de las primeras partículas de mineral; y c) inhibiendo el crecimiento cristalino en direcciones concretas con la producción de moléculas para tal fin, obteniéndose minerales con formas específicas.

Concretamente en las cuevas, los procesos de precipitación y disolución pueden resultar en la deposición de espeleotemas de carbonatos, silicatos, óxidos de manganeso y hierro, compuestos de azufre y nitratos. En dichos procesos, los microorganismos pueden tener un papel pasivo, sirviendo como puntos de nucleación, o activo, por ejemplo produciendo enzimas que inducirían la mineralización (Northup y Lavoie, 2001).

La disolución de la superficie de los minerales inducida por los microorganismos puede llevarse a cabo de distintas maneras. Según Sand (1997), la acción de estos microorganismos se puede resumir en nueve categorías, entre las que destacan: la presencia física de las células microbianas (favoreciendo la nucleación), el ataque mediante ácidos orgánicos, inorgánicos y otros solventes orgánicos (provocando cambios en el pH, la hidrólisis del material y la disolución de paredes y espeleotemas de la cueva), el estrés salino provocado por los productos de estas reacciones atacantes (favoreciendo la cristalización y el aumento del volumen) y la excreción de sustancias poliméricas extracelulares (generalmente conocidas por sus siglas en inglés "EPS"), exoenzimas y agentes quelantes (dando lugar a biofilms microbianos, convirtiendo compuestos insolubles en solubles, reteniendo agua, incrementando la presión, etc.).

Aunque la sola presencia física de células microbianas podría ser suficiente para que pudieran formarse minerales, generalmente tiene más influencia la excreción de productos metabólicos intermediarios y finales, tales como las enzimas. Estos factores actúan de forma combinada para dar lugar al biomineral final. Ya que a menudo hay

ciclos metabólicos implicados, es necesario realizar análisis microbiológicos para dilucidar el mecanismo real y no únicamente análisis químicos (Sand, 1997).

Los procesos de disolución de más interés en cuevas son aquellos que involucran a bacterias oxidantes de hierro, azufre y manganeso (Northup y Lavoie, 2011).

Actualmente, el número de minerales observados en cuevas supera los 350, muchos de ellos de origen biológico (Onac y Forti, 2011b; Tazaki, 2006). Los biominerales más comunes son los óxidos (fundamentalmente magnetita, goethita, hematita, ferrihidrita y distintos óxidos de manganeso, como la birnesita), carbonatos, fosfatos, sulfatos y sulfuros (Konhauser, 2007).

Los espeleotemas estudiados en esta tesis doctoral corresponden a depósitos negros de diferente naturaleza, moonmilk, coraloides y mucolitos (Figura 1.1).

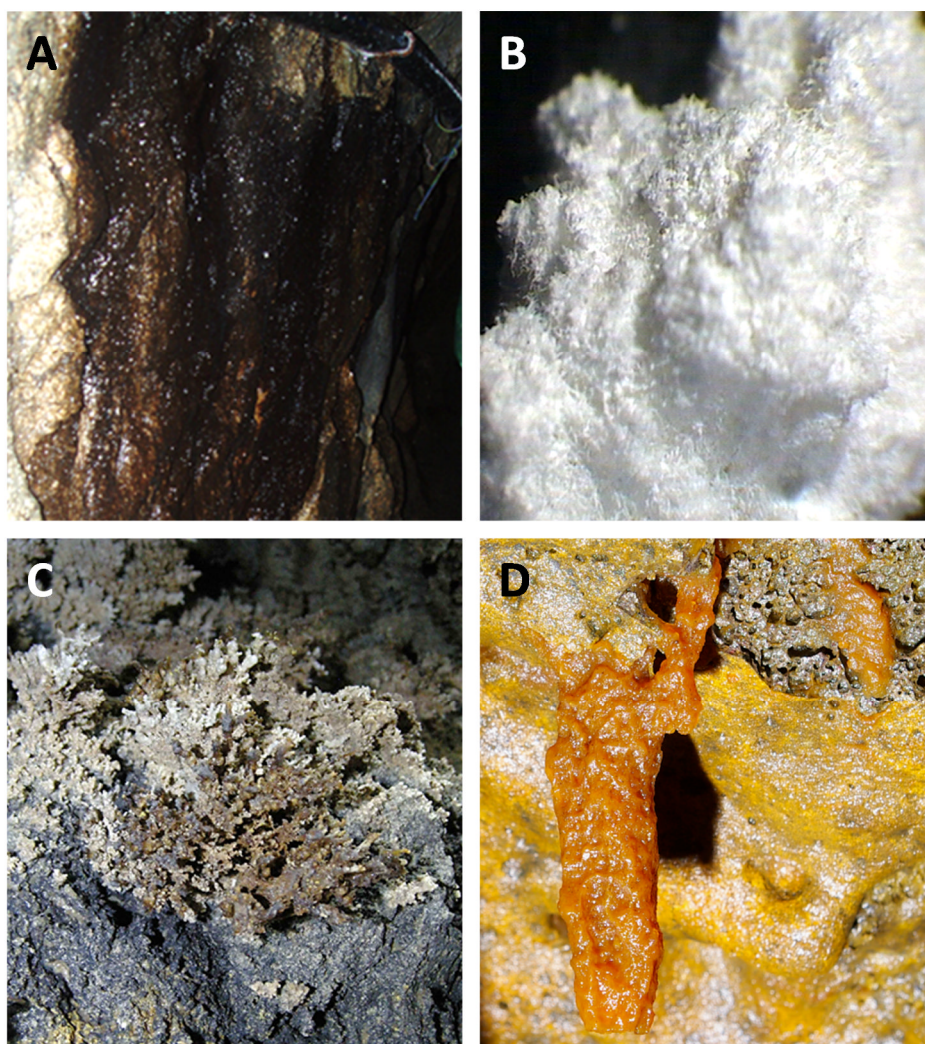


Figura 1.1 Fotografías de los tipos de espeleotemas analizados en esta tesis doctoral. A. Depósitos negros del túnel de Paranhos (Portugal). B. Moonmilk del túnel de Paranhos (Portugal). C. Coraloides del tubo de lava Royal Palm (Islas Galápagos, Ecuador). D. Mucolitos de la Cueva Los Caños (Islas Canarias, España).

1.2.1 DEPÓSITOS NEGROS, ÓXIDOS DE MANGANESO

Dorn (1998), definió estos depósitos como revestimientos adheridos en la superficie de la roca mediante procesos fisicoquímicos, mediados biológicamente con frecuencia. Aunque los depósitos negros encontrados en cuevas suelen corresponder a óxidos de manganeso, siempre es necesario llevar a cabo un estudio en profundidad para descartar otros agentes que generan la misma coloración, tanto de fuentes naturales (materia orgánica, guano, etc.) como antropogénicas (alquitranes, hollín, etc.) (Hill, 1982; Šebela y col., 2015).

Los compuestos de manganeso en las cuevas se presentan generalmente como depósitos blandos, menos cohesivos, recubriendo las paredes y otros espeleotemas (Moore y Sullivan, 1978; Rogers y Williams, 1982) (Figura 1.1 A) o por el contrario formando cortezas más consolidadas (Peck, 1986). El mineral de manganeso más frecuente en las cavidades subterráneas es la birnesita (Hill y Forti, 1997). En estos ambientes también existen otros óxidos e hidróxidos de manganeso poco cristalinos (todorokita, pirolusita, romanechita, etc.) (Onac y col., 1997).

Los depósitos ricos en óxidos de manganeso poseen colores concretos, en una gama que va desde el marrón oscuro al negro, comúnmente en mezclas de varios compuestos (Onac, 2012). El manganeso en la birnesita no está totalmente oxidado, de manera que el Mn^{4+} y el Mn^{3+} coexisten en la misma estructura mineral. El intercambio de electrones entre los dos estados de valencia desencadena una amplia absorción a lo largo de todo el espectro visible, motivo por el que el material se observa de color negro (White, 1997). Con el término general de “wad” se denomina a aquellas mezclas de minerales de óxidos de manganeso y de hierro, que aparecen vinculados en muchos casos (Kashima, 1983). Precisamente, la composición variable y la presencia de asociaciones de diferentes componentes hacen que la identificación de estos depósitos resulte compleja.

Los procesos de biomineralización que implican al manganeso son comunes, debido a su relativamente alta concentración en la corteza terrestre (Frankel y Bazylinski, 2003). Los minerales de óxidos e hidróxidos de manganeso biogénicos (agrupados bajo el término “óxidos de Mn”) se caracterizan por ser materiales nanoparticulados y criptocristalinos, que representan las fases de óxido de Mn más altamente reactivas e importantes en el medio ambiente (Villalobos y col., 2005; Bargar y col., 2005). Su incremento en la reactividad respecto a sus análogos sintéticos o abióticos es debida a su menor tamaño cristalino y mayor área superficial (Santelli y col., 2010, 2011) y a su gran capacidad para adsorber elementos traza (Cu, Co, Zn, Ni, Ca, Fe, etc.), incluyendo los de contaminantes prioritarios (Pb, As y U) (Boonfueng y col., 2009; Nelson y col., 2002), entre otros.

Se conoce que la dinámica del proceso de oxidación biológica del manganeso consiste en acelerar el ratio de oxidación en comparación con la catálisis abiótica en la superficie del mineral, incluso más de cinco órdenes de magnitud (Tebo y col., 2004; Northup y Lavoie, 2001).

La habilidad de oxidar manganeso está ampliamente distribuida entre las bacterias, los hongos, las algas y los protozoos (Ghiorse, 1984). Sin embargo, los microorganismos oxidantes de Mn(II) capaces de provocar la precipitación de óxidos de Mn en la naturaleza son principalmente bacterias y hongos (Toner y col., 2005; Webb y col., 2005a; Miyata y col., 2006).

El grupo de bacterias oxidantes del manganeso es un conjunto filogenéticamente diverso, caracterizado por la habilidad para catalizar la oxidación del manganeso divalente y soluble, Mn(II), a óxidos de manganeso insolubles con la fórmula general MnO_x (donde X es un número entre 1 y 2) (Nealson, 2006). Las bacterias oxidantes de Mn(II) son ubicuas en la naturaleza. Técnicamente, pueden aislarse de cualquier muestra ambiental, pero son más frecuentes en aquellos lugares en los que existe un abastecimiento adecuado de Mn(II) reducido, como sistemas y sedimentos acuáticos, y menos en medios terrestres como las cuevas (Tebo y col., 2005).

Aunque la oxidación bacteriana del Mn(II) está extendida, no está claro el motivo por el cuál las bacterias oxidan el manganeso, al igual que tampoco se conoce el mecanismo exacto del procedimiento (Miyata y col., 2006; Learman y col., 2011). De hecho, la oxidación podría ser fortuita, resultante de interacciones no específicas con productos celulares o extracelulares. También se ha sugerido que podría ser un vestigio evolutivo sin relevancia fisiológica (Edwards y col., 2003). A pesar de ello, es de presuponer que han de existir razones evolutivas de peso para poseer este rasgo, ya que muchas bacterias diferentes oxidan Mn(II) e incluso bacterias con actividades enzimáticas específicas se han hallado incrustadas en óxidos de manganeso (Tebo y col., 2005).

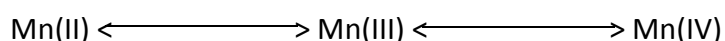
Los beneficios potenciales de la oxidación del Mn(II) son numerosos. Tebo y col. (1997), indicaron que puede tratarse de un mecanismo de protección, por el cual las bacterias oxidantes de Mn(II) se protegen de radiaciones UV, depredadores, ataques virales, estrés oxidativo y toxicidad por metales pesados, al quedar cubiertas con los óxidos de manganeso. También puede beneficiar en el almacenamiento de un aceptor de electrones y la obtención de energía para el crecimiento (Sunda y Kieber, 1994). Sin embargo, aunque la oxidación del Mn(II) a óxidos de Mn(III) o Mn(IV) es termodinámicamente favorable, no se ha encontrado evidencia inequívoca que conecte la oxidación con la conservación de energía (Tebo y col., 2005).

Diversos estudios han propuesto una implicación bacteriana en la formación de los depósitos de manganeso de las cuevas (Broughton, 1971; Crabtree, 1962; Jones 1992; Northup y col., 2000), al haberse identificado especies que mineralizan óxidos de manganeso activamente en un creciente número de linajes filogenéticos divergentes, como Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria. Algunos ejemplos son *Leptothrix discophora* (Saratovsky y col., 2006), *Metallogenium* sp. (Tebo y col., 1997), *Pseudomonas putida* (Villalobos y col., 2003), *Pedomicrobium* sp. (Ridge y col., 2007), *Hyphomicrobium* sp. (Northup et al., 2003) y varias especies marinas de *Bacillus* (Webb y col., 2005b).

De los estudios de la oxidación del manganeso por bacterias se desprende que existen dos posibles mecanismos mediante los cuales las bacterias podrían oxidar el manganeso (Northup y col., 1997): indirectamente o directamente. El mecanismo indirecto involucra la producción de un agente oxidante o radical libre (por ejemplo: peróxido de hidrógeno), o la modificación del entorno (por ejemplo: cambio en el pH), creándose así las condiciones necesarias para la oxidación del Mn (Tebo y col., 1997). Por el contrario, la oxidación directa puede ocurrir mediante la unión del Mn(II) a sustancias cargadas negativamente en la superficie celular, o mediante la acción de proteínas de unión de Mn(II), tanto intracelulares como extracelulares (Ghiorse, 1984).

Aunque el mecanismo de la oxidación del Mn(II) todavía no ha sido descrito, se conocen detalles de una ruta bioquímica funcional y regulada para el proceso. Las enzimas de tipo MCO – Oxidasas Multicobre, poseen un papel importante en la oxidación del Mn(II) en diversas especies (Tebo y col., 2005; Dick y col., 2009). A modo de ejemplo, el gen *mofA* codifica una MCO involucrada en la oxidación del manganeso en la bacteria *Leptothrix discophora* (Corstjens y col., 1997).

Los estudios genéticos indican que es muy probable que la oxidación del Mn(II) en las células vegetativas se lleve a cabo en la superficie celular. Además, el Mn(III) es un producto intermedio de la oxidación del Mn(II) y la reducción del Mn(IV) (Webb y col., 2005b), de la siguiente forma:



Debido a que el Mn(III) es inestable como ion libre, rápidamente se convierte a Mn(IV) o revierte a Mn(II) (Morgan, 2000). El óxido de manganeso en forma Mn(IV) es insoluble y por tanto precipita, formando los depósitos negros (Nealson, 2006).

Aunque las bacterias tienen un papel importante en la formación de óxidos de Mn biogénicos, los hongos ascomicetos también son capaces de catalizar esta reacción (Tani y col., 2004a, 2004b) y, aunque el mecanismo de la deposición de los óxidos de Mn es desconocido, parece bastante similar al estudiado en bacterias (Tebo y col., 2005). Algunos autores han identificado la birnesita y la todorokita como productos de la oxidación del Mn(II) por hongos (Miyata y col., 2006; Saratovsky y col., 2009).

El papel de las arqueas en la oxidación del Mn(II) o del Fe(II) no ha sido directamente demostrado ni tampoco se ha descrito ninguna arquea oxidante de Mn (II) hasta la fecha (Tebo y col., 2005).

A pesar de que los depósitos de óxidos de manganeso de las cuevas casi siempre están compuestos de minerales de tipo birnesita (Northup y Lavoie, 2001; Northup y col., 2003; Miller y col., 2012a) o todorokita (Northup y col., 2003; Spilde y col., 2005; Chalmin y col., 2006) no hay que olvidar que en muchas ocasiones aparecen asociados con óxidos de Fe, por la presencia en el mismo medio de bacterias oxidantes del hierro como *Gallionella* sp., *Leptothrix* sp. y *Thiobacillus* sp., dando lugar a depósitos de ferromanganeso (Northup y col., 1997; Northup y col., 2003; Spilde y col., 2005).

1.2.2 CARBONATOS Y MOONMILK

Los carbonatos son los minerales biogénicos más abundantes (Lowenstam y Weiner, 1989).

El depósito de carbonatos en las cuevas viene dictado por la disponibilidad de agua sobresaturada de percolación introducida en las galerías (Onac, 2012). En la Figura 1.2 se puede observar un resumen de la ruta química que siguen las aguas de percolación por la secuencia vertical aire-suelo-roca. El agua meteórica se acidifica con el dióxido de carbono atmosférico, $\text{CO}_{2(\text{atm})}$. A medida que las aguas van introduciéndose a través del suelo con materia orgánica en descomposición, su contenido en $\text{CO}_{2(\text{bio})}$ se incrementa. Una vez dentro de la cueva, el agua pierde CO_2 disuelto, causando la sobresaturación del agua con respecto al calcio, lo que puede provocar la precipitación de carbonatos.

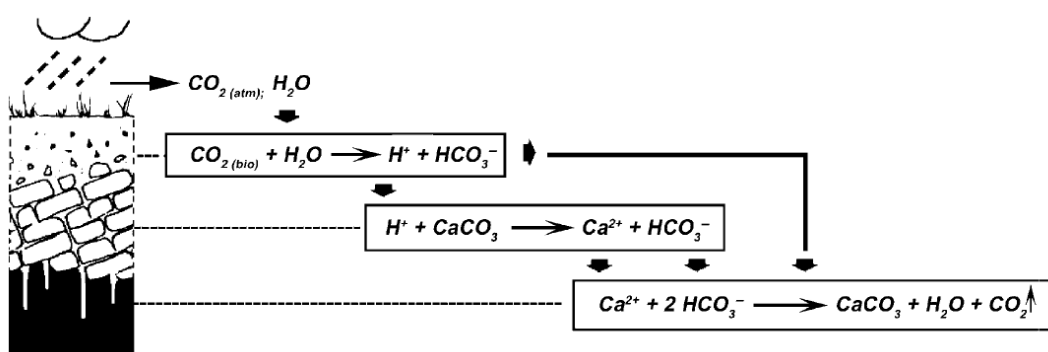


Figura 1.2. Reacciones en el sistema aire-suelo-roca y la deposición de carbonatos.

Fuente: modificado de Onac, 2000.

Sin embargo, es preciso señalar que en realidad se trata de un proceso mucho más complejo. Los microorganismos de las cuevas pueden inducir la precipitación de los carbonatos mediante procesos de biomineralización (Cañaveras y col., 2001;

Cuezva y col., 2009) y también procesos de disolución debido a la excreción de ácidos (Northup y Lavoie, 2001; Engel, 2007).

La deposición mineral puede ser resultado de las actividades metabólicas de las bacterias, al desencadenar un cambio en la composición química del medio que provoque la sobresaturación y la consecuente precipitación del CaCO_3 (Onac, 2012). En los procesos biológicos, la sobresaturación está considerada como un importante requisito previo para que se pueda producir la precipitación de los minerales que forman parte de las soluciones (Fortin y col., 1997). Además, las superficies celulares poseen carga negativa, lo que les otorga la capacidad de adsorber iones como Ca^{2+} y Mg^{2+} , siendo el paso inicial para que el carbonato precipite en ellas, puesto que la célula termina actuando como sitio de nucleación, un etapa crítica en la precipitación mineral en general (Northup y Lavoie, 2001). Riding (2000) señaló que la producción microbiana de EPS, capaces de atrapar sedimentos, es crítica para la creación de carbonatos microbianos.

Por otra parte, la formación de carbonatos es un proceso muy común entre las bacterias, generado en muchas ocasiones por el propio proceso de crecimiento bacteriano (Miller y col., 2013). Algunos ejemplos de bacterias carbonatogénicas se encuentran en los géneros *Pseudomonas* (Baskar y col., 2006), *Vibrio* (Rivadeneira y col., 1994), *Halobacillus* (Rivadeneira y col., 2004), *Bacillus* (Castanier y col., 2000) y *Streptomyces* (Cañaveras y col., 1999; Laiz y col., 1999). La formación de carbonatos también se ha constatado entre bacterias reductoras de sulfato y cianobacterias (Wright, 1999), así como en mixobacterias (González-Muñoz y col., 1996).

Se han descrito bacterias, hongos y algas implicados en la precipitación de carbonatos en cuevas (Cox y col., 1995; Borowitzka, 1982; Danielli y Edington, 1983; Went, 1969). Las hifas fúngicas pueden actuar como núcleos para procesos de cristalización y como puntos de fijación de cristales (Went, 1969). Las algas y cianobacterias precipitan carbonato de calcio cambiando el microclima al fijar dióxido de carbono (Cox y col., 1989).

La mineralización de carbonato de calcio por bacterias aisladas de cuevas y otros ambientes subterráneos ha sido comprobada por diversos autores (Groth y col., 2001; Sanchez-Moral y col., 2003). Laiz y col. (2003) verificaron que el 61% de las actinobacterias aisladas de cuevas producían cristales en medios de cultivo. Por ejemplo, Cuezva y col. (2012) pusieron de manifiesto que en la Cueva de Altamira algunas colonias eran capaces de capturar el CO_2 atmosférico y también inducir biológicamente la precipitación de CaCO_3 .

El moonmilk es un tipo de espeleotema común en ambientes subterráneos de todo el mundo (Fig 1.1 B). No engloba una definición mineralógica, sino que hace referencia únicamente a su aspecto (Curry y col., 2009), ya que describe agregados de

minerales carbonatados con textura similar a la de una masa pastosa, de aspecto cremoso, gran plasticidad y untuosa al tacto, pero de diferentes orígenes y composiciones minerales (Baskar y col., 2011).

El término moonmilk proviene de una cueva suiza en la que fue descrito por primera vez, denominada con el nombre de “Höhle mondmilchloch”, es decir, “Caverna de la leche de luna”. Como su nombre deja entrever, la cueva es rica en estos depósitos no consolidados de color blanco (Durán y col., 2001).

Se le han atribuido supuestas virtudes terapéuticas, de tal manera que incluso ha sido empleado por la farmacopea europea durante los siglos XVI a XVIII como remedio frente a diversas enfermedades (antiácido, secante de úlceras, antidiarreico, etc.) e incluso como cosmético embellecedor de caras y manos (Hill y Forti, 1997).

Es un depósito identificado únicamente en ambientes subterráneos (Bull, 1983). Típicamente, aparece en cuevas kársticas (Fischer, 1988), pero también puede observarse en tubos de lava (Polyak y Provencio, 2006) e incluso en túneles subterráneos artificiales, como es el caso de uno de los moonmilk estudiados en esta tesis. Los principales componentes del moonmilk son la calcita, hidromagnesita, aragonito, vaterita y huntita, todos ellos minerales carbonatados (Cuezva y col., 2003). Además, es posible encontrar nitratos y sulfatos formando parte de estos espeleotemas, pero en menor proporción (Martínez-Arkarazo y col., 2007).

La calcita que forma el moonmilk, frecuentemente se presenta en forma de agujas, denominada “needle fibre calcite” (NFC) en inglés. Este aspecto es común en ambientes vadosos especialmente, siendo el caso de muchas cuevas (Cailleau y col., 2009).

El origen del moonmilk es un tema controvertido que ha generado un sinfín de debate en los últimos años (Durán y col., 2001). Es cuestionable si la precipitación de la calcita es inducida microbiológicamente o si por el contrario se trata meramente de un proceso inorgánico. Teniendo en cuenta la gran variedad de minerales que forma parte del moonmilk, no es sorprendente que a su formación se le hayan atribuido tanto procesos fisicoquímicos abióticos como procesos bióticos, e incluso una combinación de ambos (Richter y col., 2008).

De los cuatro posibles orígenes para el moonmilk propuestos por Hill y Forti (1997), en dos de ellos están implicados los microorganismos: la corrosión bioquímica de la roca y la precipitación activa del moonmilk por bacterias. Algunos autores han atribuido la precipitación de fibras cristalinas de calcita en el moonmilk a los microorganismos (Baskar y col., 2011; Cañaveras y col. 2006; Curry y col., 2009; Blyth y Frisia, 2008).

La dificultad a la hora de comprobar el papel activo de los microorganismos en la formación de los depósitos de moonmilk todavía persiste, ya que aquellos que pudieron controlar la precipitación originalmente puede que no hayan permanecido en el espeleotema con el paso del tiempo. La falta de evidencia de células activas viables es uno de los principales problemas en estos estudios (Northup y col., 1997).

Cañaveras y col. (2006) establecieron que los depósitos de moonmilk mostraban diferentes microfibras relacionadas con las diferentes etapas de formación del espeleotema y sugirieron que las bacterias estaban involucradas en este proceso.

Debido a que los iones Ca^{2+} resultan tóxicos para las células, se ha propuesto que el proceso de producción de CaCO_3 es un mecanismo de desintoxicación mediante el cual las bacterias podrían sobrevivir. Así, la conservación de este fenotipo podría resultar una ventaja evolutiva, debido a la amplia distribución del mismo, aunque la capa impermeable de CaCO_3 que cubre la célula causaría su muerte inexorablemente (Banks, 2010).

Las actinobacterias están consideradas uno de los principales integrantes de la comunidad microbiana del moonmilk, capaces de generar los filamentos típicos que lo componen (Maciejewska, 2015; Cuezva y col., 2012).

Por otra parte, las estructuras fúngicas y la calcita en forma de aguja poseen similitudes entre sí. Estas analogías han llevado a proponer un origen biogénico fúngico frecuentemente (Bindschedler, 2010, 2012), ya que en teoría la rotura de las paredes celulares de las hifas de los hongos podría generar nanofibras. Sin embargo, para conocer la implicación exacta de los hongos en la mineralización del carbonato de calcio es preciso encontrar más evidencias, ya que hasta ahora los hongos aislados de estos espeleotemas, como *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Phialophora* sp., *Aspergillus* sp., *Arthroderma* sp. y *Cladosporium* sp., son comunes en el aire o parecen provenir de esporas aerotransportadas, quedando finalmente depositadas en los espeleotemas (Rooney y col., 2010; Vaughan y col., 2011; Porca y col., 2011).

También se han encontrado comunidades de arqueas en el moonmilk, demostrando así su distribución ubicua (Reitschuler y col., 2014).

A pesar de la riqueza del moonmilk en microorganismos, sigue sin obtenerse respuesta a día de hoy para la pregunta de si son esenciales para su formación. Sin embargo, las indagaciones en el tema son cada vez más profundas, acercándose el día en el que finalmente se descubrirá el verdadero origen del moonmilk (Cacchio y col., 2014).

1.2.3 SILICATOS Y CORALOIDES

Los silicatos constituyen una tercera parte de todas las especies minerales. Algunos ejemplos que se pueden hallar en cuevas corresponden a los minerales de la arcilla, cuarzo y ópalo (Northup y Lavoie, 2001).

Las arcillas cuentan con factores que pueden favorecer la colonización microbiana, entre los que se encuentran su elevada superficie específica, la riqueza en Fe, la existencia de áreas compactas anaerobias y la posibilidad de retener y neutralizar productos metabólicos de deshecho (Northup y Lavoie, 2001; Diaz-Herraiz y col., 2013). Konhauser y Urrutia (1999) demostraron la formación autocatalítica de arcillas de silicatos de hierro y aluminio en diversos estudios experimentales. Hose y col. (2000) localizaron depósitos discontinuos ricos en arcillas, denominados vermiculaciones, en la Cueva de Villa Luz (México), que contenían una población diversa de macro y microorganismos, descritos como “biovermiculaciones”. También es conocida la existencia de microorganismos capaces de causar la disolución del cuarzo (Hiebert y Bennet, 1992).

La sílice puede presentarse en la naturaleza de forma amorfa e hidratada, en la sustancia conocida como ópalo. Este ópalo puede ser inorgánico o biogénico, denominado en este último caso Ópalo-A (Carretero León y Pozo Rodríguez, 2007). Este precipitado amorfo se halla principalmente en tubos de lava, siendo el motivo por el que la mayor parte de los espeleotemas de ópalo, como los coraloideos, surgen en estas cuevas volcánicas (Onac, 2012).

Los coraloideos son una variedad de espeleotemas nodulares, globulares, botroidales (en forma de racimos de uvas), o con forma de ramas de coral (Figura 1.1 C). De manera coloquial, se les denomina palomitas de maíz (popcorn en inglés), uvas, coliflores o corales, debido a los nódulos que presentan. Son probablemente el tipo de espeleotemas más común tras las estalactitas y estalagmitas. Poseen tamaño muy variable, desde pequeñas cuentas de collar hasta masas de más de un metro de diámetro. La enorme variedad de tamaños y formas de los coraloideos es debida al desarrollo sufrido en los distintos ambientes. Así, los coraloideos en el medio subaéreo tienden a ser pequeños y nudosos, mientras que en medio acuático son frecuentemente más grandes y con un contorno más uniforme (Hill y Forti, 1997; Castaño de Luis y col., 2010). Uno de los principales componentes de estos espeleotemas de crecimiento concéntrico suele ser la calcita, pero también pueden estar muy presentes el ópalo, particularmente ópalo-A, y el cuarzo, además de yeso y otros minerales (Webb y Finlayson, 1987; Wray, 1999).

Aunque los mecanismos de formación de los coraloideos ricos en calcita están relacionados con la presencia de finas películas de agua y mecanismos hídricos, como infiltraciones de agua en las cuevas, salpicaduras del agua de goteo, condensaciones,

evaporaciones, etc. (Palmer, 2007; <http://www.cuevadenerja.es/>), en el caso de los coraloides de ópalo la situación parece ser distinta. Diversos autores han hallado filamentos orgánicos de bacterias ferruginosas en coraloides de ópalo de cuevas de Venezuela y Sicilia (Kunicka Goldfinger, 1982; Urbani, 1976; Forti y Rossi, 1987). Forti (1994) encontró estructuras orgánicas en secciones delgadas de coraloides, sugiriendo que probablemente debían su origen en cierta medida a reacciones orgánicas. Urbani (1996) por su parte, localizó filamentos y formas redondeadas, indicando que las algas y las bacterias se pueden hallar frecuentemente en los coraloides de ópalo. La presencia de estructuras bacterianas silicificadas en estos espeleotemas otorga también evidencia a su posible origen biológico (Vidal Romaní y col., 2010a; Willems y col., 2002). Por otra parte, se han hallado algas diatomeas asociadas con estos minerales (Kashima, 1986). Además, De los Ríos y col. (2011) identificó bacterias oxidantes de Fe(II) en unos depósitos de ferrihidrita ricos en silicio.

La implicación de microorganismos en la formación y el deterioro de espeleotemas de silicato es un área abierta al estudio. Son necesarios un mayor número de estudios experimentales y descriptivos sobre el ópalo y el cuarzo. Tampoco se ha descubierto todavía de forma concluyente el papel de los microorganismos en la formación de las vermiculaciones (Northup y Lavoie, 2001).

1.2.4 MUCOLITOS

Bajo el término “mucolitos”, se designa a un grupo heterogéneo de espeleotemas con forma de pseudo-estalactitas mucosas, que tienen como característica en común una composición rica en materia orgánica. Poseen abundante material gelatinoso y viscoso, con la consistencia del moco y color negro, marrón o amarillo pálido (Figura 1.1 D). Se han descrito depósitos de esta índole en tubos de lava, recubriendo las paredes (Hathaway y col., 2014a; White, 2010) y también en minas de agua (Miller y col., 2014a).

En aspecto, son similares a los espeleotemas denominados “*snottites*”, pero estos últimos son estalactitas de biofilms microbianos extremadamente ácidos, que se localizan en cuevas saturadas de ácido sulfúrico (Hose y Pisarowcz, 1999; Jones y col., 2012). La materia orgánica producida durante los procesos de oxidación que involucran al ciclo del azufre puede generar depósitos viscosos, que con el tiempo pueden cristalizar y generar diferentes minerales, algunos productos de las reacciones redox mientras que otros son formados como resultado de reacciones de sustitución dobles que implican al ácido sulfúrico, la roca y sedimentos de la cueva (Onac y Forti, 2011b).

Como se puede intuir, es un término amplio, que agrupa no solo a formaciones de azufre, sino también a espeleotemas con otras composiciones. Por ejemplo, De los Ríos y col. (2011) examinaron espeleotemas ocre de un tubo de lava en la Isla Terceira

(Azores, Portugal), concluyendo que los depósitos eran de ferrihidrita y ricos en silicio. Otros mucolitos también pueden presentar calcita entre sus componentes (Miller y col., 2016).

La matriz viscosa común rica en materia orgánica de estos espeleotemas está asociada a tipos bacterianos específicos, de manera que podrían condicionar la estructura final del espeleotema por su acumulación, las actividades metabólicas desarrolladas y posterior cementación inorgánica (De los Ríos y col., 2011; Forti, 2005; Calaforra y col., 2008).

Miller y col. (2014a) concluyeron que los mucolitos encontrados en una mina de agua de Braga (Portugal), eran minerales del grupo de la jarosita, que estaban embebidos en una matriz orgánica similar a los EPS, lo que apunta a un origen biogénico. Esta clase de mineral se forma por la oxidación de depósitos de sulfuros, asociados generalmente con drenajes ácidos de las rocas y lugares de acumulación de residuos ácidos de las minas (Basciano y Peterson, 2007). Dicha oxidación se intensifica por la presencia de bacterias oxidantes de hierro y azufre, como *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, respectivamente (Ziegler y col., 2009; Jones y col., 2012). Ziegler y col. (2013) encontraron arqueas en los *snothites* de una mina de piritita alemana. Otros autores han sugerido que el ciclo del azufre involucra reacciones redox totalmente catalizadas por los microorganismos, que son capaces de controlar cada uno de los pasos de oxidación/reducción, llevando al desarrollo de diferentes minerales de esta clase (Forti y Salvatori, 1988).

En ocasiones, también pueden existir acumulaciones de materiales vegetales que se infiltran en las cuevas y pueden dar lugar a distintas clases de espeleotemas (Daza Brunet y Bustillo Revuelta, 2014), los mucolitos entre ellos (Miller y col., 2016).

1.3 GEOMICROBIOLOGÍA DE CAVIDADES GRANÍTICAS: MINAS DE AGUA

Las cuevas en granito son limitadas y en algunos casos están pobremente investigadas o incluso inexploradas. El granito es un tipo de roca ígnea, que se forma a grandes profundidades relativas (Bakewell, 1839). Constituido esencialmente por cuarzo, feldespato y mica, el granito es rico por tanto en sílice y distintos silicatos de aluminio, hierro, calcio, y magnesio. Debido a su inaccesibilidad, existe una dificultad intrínseca a la hora de llevar a cabo investigaciones en estos ambientes. Pueden llegar a ser necesarias perforaciones en el terreno o incluso construcciones de túneles (Pedersen, 1993) para poder tener acceso a formaciones de este tipo de rocas.

Es frecuente que la roca granítica posea acuíferos que discurren a través de las fallas y fracturas en la misma (Pedersen, 1997). El ser humano ha aprovechado esta circunstancia a lo largo de la historia, mediante la construcción de canalizaciones para captar el agua potable, conducirla y distribuirla por las poblaciones. Dichas estructuras

se denominan de diversas maneras: minas de agua, galerías de captación, acueductos subterráneos, “qanats”, manantiales, alcavons, etc. De manera similar a los pozos, las minas de agua se construyen para alcanzar las vetas de las aguas subterráneas, pero están elaboradas con una ligera pendiente hacia el exterior, lo que permite la extracción del agua por efecto de la gravedad. En ocasiones, el agua drenada es conducida mediante una acequia, protegida entre las paredes de piedra granítica.

El origen de este tipo de galerías se remonta a época romana, aunque fueron los árabes los que las desarrollaron y difundieron en un amplísimo territorio (Suárez Moreno, 2002). Son un método utilizado en todo el mundo, incluso en zonas tan distantes entre sí como China, Persia (antiguo Irán), la Península Ibérica y Latinoamérica, sobre todo en las regiones con escasez de aguas superficiales (Santamarta Cereza y Suárez Moreno, 2015).

A pesar de que algunas galerías de captación siguen jugando un papel activo en la obtención de agua potable, el paso de los años ha provocado que otras tengan usos limitados. Es el caso de las minas de Paranhos (Oporto, Portugal) cuyas aguas únicamente se usan para irrigación (Chaminé y col., 2010). También existen localizaciones en las que las minas de agua están totalmente fuera de servicio en la actualidad, como ocurre en Braga (Portugal) (Lopes y col., 2008).

Los ambientes subterráneos excavados horizontalmente en granito, suelen constituir áreas más superficiales, susceptibles de ser investigadas con una mayor facilidad. Los estudios sobre las comunidades microbianas en estos ambientes subterráneos son escasos, pero resultan de gran interés para tener conocimiento de las especies de microorganismos adaptadas a las rocas graníticas y sus interacciones con los minerales (Vidal Romaní y col., 2010b). En concreto, las minas de agua excavadas en granito atraen el interés de los científicos por varias razones, como los problemas de contaminación de las aguas potables y filtraciones de residuos tóxicos. Los ambientes subterráneos en granito a gran profundidad también pueden ser empleados como lugares de almacenamiento de residuos nucleares (West y col., 1985).

Aunque las aguas subterráneas son generalmente pobres en nutrientes, se han podido encontrar bacterias en esta clase de ambientes graníticos bajo la superficie terrestre (Pedersen, 1993; Pedersen y Ekendahl, 1990), además de diversos minerales que forman espeleotemas en su interior (por ejemplo, estruvita, alófono, hematita, goethita, halita, yeso, anhidrita, ópalo-A, birnesita y todorokita, entre otros) (Sallstedt y col., 2014; Miller y col., 2011). La calcita no es un mineral habitual en este tipo de rocas graníticas, motivo por el cual el moonmilk no es un espeleotema típico sobre estas superficies ni se encuentra descrito en la literatura como tal.

Una característica observada hasta ahora en los espeleotemas de las cavidades graníticas es que su composición química, aunque muy variada, siempre es monomineral, lo que apunta en principio a un único proceso de génesis (Vidal Romaní y col., 2010b).

El agua que se infiltra desde la superficie a través de las fracturas en roca granítica puede ver modificada su composición por acción de los microorganismos de este ambiente, influyendo en la formación de depósitos minerales. Los microorganismos cultivables de ambientes subterráneos graníticos suelen ser reducidos, por lo que puede resultar compleja la identificación de las comunidades existentes (Pedersen, 1997). Sahl y col. (2008), estudiaron la diversidad microbiana de una fractura granítica profunda en Colorado (EEUU), perteneciendo la mayoría de las bacterias a los filos Firmicutes y Proteobacteria, con poca diversidad. Sin embargo, los análisis filogenéticos confirmaron la presencia de una nueva división en el dominio Bacteria.

Uno de los autores que más ha estudiado la microbiología de minas excavadas en granito ha sido Karsten Pedersen junto a sus colaboradores (Pedersen, 2012, 2013; Anderson y col., 2006, 2007; Jägevall y col., 2011). De entre sus lugares de estudio destacan la mina de Stripa y el llamado Äspö Hard Rock Laboratory, ambos en Suecia, habiendo encontrado en ellas diferentes tipos de microorganismos. En la mina de Stripa, todas las bacterias halladas pertenecían a Proteobacteria, dentro de las clases Betaproteobacteria y Gammaproteobacteria (Ekendahl y col., 1994). Aproximadamente el 75% de los clones secuenciados se correspondían con una única bacteria, variable según el nivel de profundidad de la mina estudiado. Estas bacterias predominantes pertenecían a la clase Betaproteobacteria (Pedersen, 1993). Por el contrario, en Äspö fue posible detectar la presencia de bacterias reductoras de sulfato y bacterias anaerobias presumiblemente metanogénicas (Pedersen y Ekendahl, 1990). En un principio, pudo constatar la presencia de diferentes especies de los géneros *Pseudomonas* y *Shevanella* (Pedersen, 1993), pero en estudios posteriores fueron identificadas también bacterias heterotróficas facultativas de los géneros *Serratia*, *Bacillus*, *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Eubacterium* y *Methanomicrobium* (Pedersen, 1997). Consecuentemente, se dedujo que Äspö tenía una comunidad microbiana más diversa que Stripa, pero aun así escasa (Pedersen, 1993).

Diversos procesos biogeoquímicos detectados en la roca granítica ponen de manifiesto que los microorganismos pueden tener su importancia, como los llevados a cabo por bacterias reductoras de hierro y reductoras de sulfato, que aparecen frecuentemente en acuíferos graníticos profundos (Laaksoharju y col., 1995; Banwart, 1995). Además, el agua subterránea rica en hierro ferroso, Mn(II) y compuestos de azufre reducido en túneles graníticos permite el crecimiento de bacterias quimiolitotróficas (Pedersen, 1997).

Estos hechos demuestran que el conocimiento de la biodiversidad y la función de los microorganismos en los ambientes subterráneos graníticos, bastante limitado todavía, es de gran interés, y permitiría además expandir nuestra comprensión de su interacción con minerales (Miller y col., 2012b).

Uno de los mayores desafíos que posee la geomicrobiología actualmente consiste en lograr la identificación de filamentos microbianos con morfología reticulada, denominados filamentos reticulados (Melim y col., 2008), que participan en procesos de biomineralización y cuya identidad no ha podido ser relacionada con ningún microorganismo conocido (Melim y col., 2008, 2015; Miller y col. 2012b). Estos filamentos parecen ser abundantes en ambientes subterráneos, habiéndose hallado en cuevas calizas (Melim y col., 2008; Miller y col., 2012c) y tubos de lava (Northup y col., 2011; Miller y col., 2014b), así como en los depósitos negros de ferromanganeso que recubren las paredes de las minas de agua excavadas en granito (Miller y col., 2012a, 2012b). Debido a que mediante técnicas de microscopía electrónica se han observado que gran parte de estos filamentos se encuentran vacíos, algunos autores han sugerido que son microfósiles (Melim y col., 2008).

La geometría de las paredes de los filamentos está conformada por nanofibras reticuladas de diámetros de menos de 100 nm, orientadas paralelamente a la longitud del filamento y dando lugar a cámaras individuales hexagonales o romboidales. Dicha estructura en malla es muy similar a un panal de abeja. Los filamentos reticulados tienen aproximadamente 0,5 μm de diámetro y hasta 100 μm de longitud (Figura 1.3).

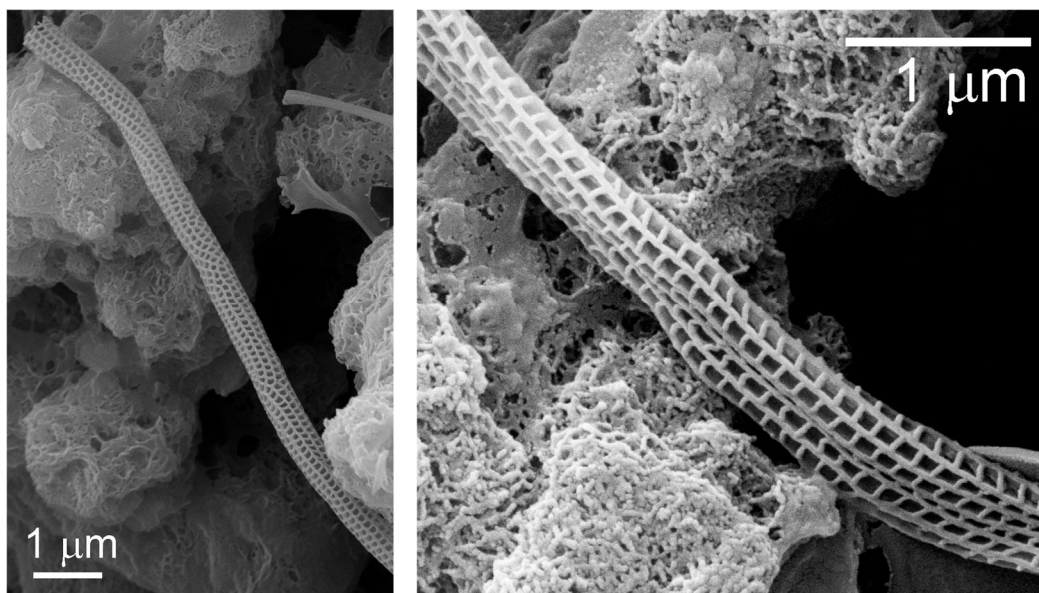


Figura 1.3 Imagen FESEM de filamentos reticulados encontrados en depósitos de ferromanganeso del túnel de Paranhos, Oporto, Portugal.

Miller y col. (2012b) aportaron un resultado muy interesante mediante Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM), revelando la presencia de estructuras

biológicas en el interior de las vainas tubulares ricas en manganeso de los filamentos, consistentes en células bacilares. Los esfuerzos para lograr identificar esta bacteria han consistido en aplicar un amplio abanico de técnicas, entre ellas la construcción de genotecas. Sin embargo, no se ha podido correlacionar ninguno de los microorganismos identificados con el microorganismo responsable de la formación de filamentos reticulados, por lo que se ha sugerido que podría tratarse de un nuevo taxón microbiano (Northup y col., 2011; Miller y col., 2012b).

También se han llevado a cabo técnicas de cultivo de muestras y comparaciones morfológicas. Sin embargo, todas ellas han fracasado, de manera que sigue sin detectarse conexión entre los filamentos reticulados y los microorganismos conocidos (Miller y col., 2012b; Melim y col., 2008; Jones, 2009). Una dificultad intrínseca a la hora de identificar los filamentos reticulados es su típica escasa abundancia. Aunque pueden encontrarse en una amplia variedad de localizaciones, el problema es que generalmente sólo son una pequeña parte de una comunidad microbiana mayor (Melim y col., 2015).

La lista creciente de apariciones de los filamentos reticulados sugiere que son habitantes ubicuos de los ecosistemas subterráneos. A pesar de que aún no se conozca su afiliación, los autores están de acuerdo en atribuirles una naturaleza microbiana y no puramente inorgánica, de manera que las investigaciones van encaminadas a conseguir aislarlos e identificarlos (Melim y col., 2015).

1.4 GEOMICROBIOLOGÍA DE TUBOS DE LAVA

Los tubos de lava son un tipo de cueva formada cuando la roca fundida emana desde la tierra, como ocurre en una erupción volcánica, y se desliza por la ladera (Figura 1.4 A). A la vez que ocurre este proceso, la lava se va enfriando tanto por la parte superior del flujo como por la inferior, mientras que la lava en medio de la corriente continúa avanzando (Figura 1.4 B). Finalmente, se endurece formando un tubo y cuando toda la lava central termina de drenar, genera una cueva abierta (Figura 1.4 C).

Su forma tubular viene dada precisamente por haberse producido un enfriamiento y posterior endurecimiento paulatino del flujo de roca fundida, quedando una carcasa de roca hueca en su interior (Dragoni y col., 1995). Por este motivo, los tubos volcánicos colapsan con frecuencia, al menos parcialmente, después de dejar de recibir nuevos aportes de lava (Figura 1.4 D).

A medida que la roca se enfría y se contrae, aparecen grietas que pueden conducir a un colapso inmediato o proporcionar vías para su posterior erosión por el agua y la congelación. Este hecho provoca que muchos tubos de lava posean temperaturas bajas, aunque pueda parecer paradójico. Al penetrar el aire frío y el

agua, quedan atrapados en su interior, desembocando en la creación de formaciones de hielo en las paredes y el suelo, muchas de las cuales son incluso capaces de permanecer en estado de congelación durante el verano (Barnes-Svarney y Svarney, 2004).

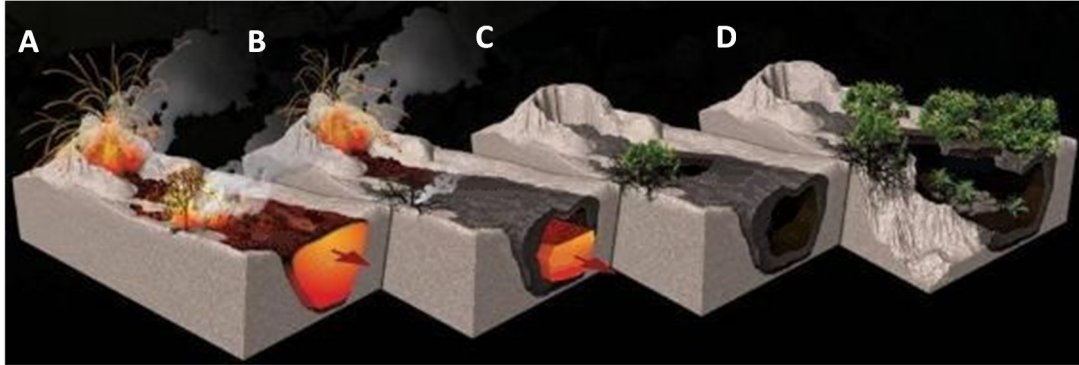


Figura 1.4 Proceso de formación de un tubo de lava. A. Erupción volcánica. B. Endurecimiento de las partes externas del flujo de lava. C. Drenado y generación de cueva abierta. D. Colapso del tubo de lava y colonización por plantas. Fuente: modificado de <http://www.blog.gpme.org.br/?p=3362>

La formación de los tubos volcánicos está aparentemente controlada, al menos en un principio, por la viscosidad del flujo de lava, que a su vez está relacionada con la química, los gases disueltos, la temperatura y velocidad del flujo (Hyde y Greeley, 1973). Incluso se pueden formar sistemas de tubos múltiples por la superposición de nuevos tubos sobre otros más antiguos, con cada erupción que tenga lugar.

Los tubos de lava se pueden hallar en muchas regiones de la Tierra, especialmente en aquellas localizaciones en las que la actividad volcánica está muy presente, como es el caso de las Islas Canarias (España). En EEUU, se han descubierto tubos de lava en California, Hawái, Idaho, Nuevo México, Oregón y Washington (Veni, 2002). La cueva más profunda de EEUU es el tubo de lava de la Cueva Kazumura (1102 m), en Hawái, que también ostenta el título del tubo de lava de mayor longitud a nivel mundial con 65500 m (<http://www.caverbob.com/lava.htm>). En Europa, los tubos de lava se localizan en Islandia (abarcando un 10% de la superficie del país), en las Islas Canarias (España) (Figura 1.5) y en el archipiélago de Azores (Portugal). Los tubos de lava de la Cueva del Viento (17032 m), en Tenerife, y la Gruta das Torres (5439 m), en Azores, ocupan también puestos muy altos en la clasificación de los tubos de lava con mayor longitud. En el continente asiático, se pueden encontrar tubos de lava en Corea del Sur, Jordania, Arabia Saudí y Japón, especialmente en las inmediaciones del Monte Fuji.

La composición de esta clase de cuevas corresponde a lava basáltica principalmente (Woo y col., 2008). El basalto es una roca volcánica cristalina formada por minerales de silicato, como clinopiroxeno, plagioclasas y olivino, además de

mineral de hierro (Rogers, 1999). Es por ello que las formaciones minerales halladas en los tubos de lava están compuestas en su mayoría por silicatos y minerales silíceos, a veces intercalados con carbonatos (White y col., 1966).



Figura 1.5 Tubo de lava localizado en las Islas Canarias (España).

Los microorganismos de las cuevas kársticas han sido muy estudiados en los últimos 20 años, mientras que los tubos de lava y sus comunidades microbianas han recibido mucha menos atención científica (Northup y Welbourn, 1997). Por este motivo, la bibliografía existente en cuanto a estudios microbiológicos llevados a cabo en estas cuevas volcánicas es relativamente escasa (Tabla 1.1). En base a los datos aportados, se puede deducir que los tubos de lava más analizados desde el punto de vista microbiológico corresponden a aquellos situados en EE.UU., concretamente en Hawái, seguidos por los de las Islas Azores (Portugal).

Tabla 1.1 Principales estudios microbiológicos realizados en tubos de lava.

Localización	Tubos de lava estudiados	Referencias bibliográfica
Washington (EE.UU.)	Slime Cave, New Cave, Dry Creek Cave, Stairwell Cave	Staley y Crawford, 1975
Idaho (EE.UU.)	Craters of the Moon	Staley y Crawford, 1975
Hawái (EE.UU.)	Kazumura	Stoner y Howarth, 1981
Hawái (EE.UU.)	Thurston	Rushforth y col., 1984
Nuevo México (EE.UU.)	Four Windows	Northup y col., 2008
Isla Fogo (Cabo Verde)	Tubo de lava sin nombre	Melim y col., 2008

Tabla 1.1 (Continuación)

Localización	Tubos de lava estudiados	Referencias bibliográfica
Hawái (EE.UU.)	Maelstrom, Kula Kai, Beall's, Kaumana, Epperson's, Bird Park	García y col., 2009
Nuevo México (EE.UU.)	Pahoehoe, Roots Galore y Four Windows	Moya y col., 2009
Hawái (EE.UU.)	Kula Kai y Thurston	Snider y col., 2009
Nuevo México (EE.UU.)	Pahoehoe y Roots Galore	Snider y col., 2009; Snider, 2010
Hawái (EE.UU.)	Kula Kai, Kaumana, Epperson's y Bird Park	Hathaway, 2010; Hathaway y col., 2014a
Azores (Portugal)	Gruta dos Principiantes, Gruta da Achada, Gruta da Branca Opala y Gruta dos Balcões	Hathaway, 2010; Hathaway y col., 2014a
Hawái (EE.UU.)	Kula Kai, Kaumana, Epperson's, Bird Park, Maelstrom y Thurston	Northup y col., 2011
Azores (Portugal)	Gruta dos Principiantes, Gruta da Achada, Gruta da Branca Opala, Gruta dos Balcões y Algar do Carvão	Northup y col., 2011
Nuevo México (EE.UU.)	Cuevas 2, 3 y 4 en el Monumento Nacional de El Malpaís y Four Windows	Northup y col., 2011
Azores (Portugal)	Buracos Cave	De los Ríos y col., 2011
Oregón (EE.UU.)	South Ice Cave	Popa y col., 2012
Isla de Ámsterdam (Sur del Océano Índico)	Tubo de lava cercano al Lower Venus Crater	Lowe y col., 2013
Hawái (EE.UU.)	Thurston, Pia Po'o, Kamana y Bird Park	Lowe y col., 2013
Isla de Pascua (Chile)	Ana Heva	Miller y col., 2014b
Azores (Portugal)	Algar do Carvao, Gruta da Branca Opala, Gruta da Madre de Deus, Gruta da Achada, Gruta das Agulhas, Gruta do Natal, Gruta da Terra Mole, Gruta da Malha, Gruta dos Buracos, Gruta dos Principiantes y Gruta da Balcoes	Hathaway y col., 2014b
Hawái (EE.UU.)	Bird Park y Kipuka Kanohina	Riquelme y col., 2015

Tabla 1.1 (Continuación)

Localización	Tubos de lava estudiados	Referencias bibliográfica
British Columbia (Canada)	Helmcken Falls Cave	Riquelme y col., 2015
Nuevo México (EE.UU.)	Cueva 12 en Monumento Nacional de El Malpaís	Riquelme y col., 2015
Azores (Portugal)	Gruta de Terra Mole y Gruta dos Montanheiros	Riquelme y col., 2015
Islas Canarias (España)	Fuente de la Canaria, Falda de La Horqueta, Llano de los Caños y Honda del Bejenado	Riquelme y col., 2015
Islas Galápagos (Ecuador)	Royal Palm y Bella	Esta tesis
Islas Canarias (España)	Llano de los Caños y Mina de los Cernícalos	Esta tesis

Uno de los primeros trabajos microbiológicos en tubos de lava sobre el que se tiene constancia es el de Staley y Crawford (1975). En sus notas, el Dr. Staley indicó que tras haber leído algunas referencias sobre un material gelatinoso no identificado que recubría las paredes y los techos de algunos tubos de lava, sintió curiosidad por conocer de qué se trataba realmente. Para ello, viajó a la zona del Lago Trout (EE.UU.), famosa por poseer cientos de tubos de lava (tantos que incluso algunos permanecen sin nombre en la actualidad) y tomó en ellos diversas muestras de material gelatinoso para proceder con su análisis. Un examen microscópico de las muestras mostró distintas especies y formas bacterianas, desde bacterias comunes hasta filamentos de lo que parecían actinomicetos. Mediante experimentos de cultivo, dedujo que las bacterias encontradas en las sustancias viscosas eran heterótrofas, las cuales probablemente usarían como fuentes de energía las sustancias disueltas en el agua de la cueva y las presentes en las raíces de las plantas. Por otra parte, en unas muestras similares tomadas en un tubo de lava de Idaho (EE.UU.), pudo cultivar tres especies del género *Streptomyces*. Años después, Stoner y Howarth (1981) fueron los primeros en describir estos biofilms gelatinosos en tubos de lava de Hawái, en los que encontraron hongos y bacterias aeróbicas, indicando su importancia para los ciclos de nutrientes, y Rushforth y col. (1984) describieron dos nuevas especies de diatomeas en un tubo de lava de la misma isla (Tabla 1.1).

Por tanto, a pesar de que la existencia de biofilms en los tubos volcánicos se conoce desde hace años, lo cierto es que el alcance de su biodiversidad se ha comenzado a revelar recientemente, con trabajos que sugieren que es mucho mayor de lo imaginado en un principio (Northup y col., 2008; Garcia y col., 2009; Snider y col.,

2009). Es de suma importancia conocer la diversidad bacteriana que existe en el interior de los tubos de lava para poder comprender qué tipo de procesos metabólicos están ocurriendo y lograr un mayor conocimiento del papel ecológico que juegan las bacterias en estos ambientes únicos (Hathaway, 2010). La composición y diversidad de dichos biofilms han sido principalmente investigadas mediante técnicas de cultivo (Staley y Crawford, 1975; Stoner y Howarth, 1981; Northup y col., 2008; Garcia y col., 2009; Moya y col., 2009; Snider y col., 2009). El desarrollo de técnicas de biología molecular ha ayudado a tener un mayor conocimiento de la diversidad bacteriana de los tubos de lava.

Con el descubrimiento de especies del género *Streptomyces* por Staley y Crawford (1975), los investigadores asumieron que los biofilms de los tubos de lava estaban compuestos principalmente por actinobacterias (Garcia y col., 2009). El filo Actinobacteria se ha hallado en más ocasiones en tubos de lava, siendo también frecuente en las cuevas en general (Northup y col., 2003; Barton y col., 2007). Son un grupo variado de bacterias Gram-positivas que poseen las inusuales características de crecimiento filamentosas y producción de esporas. Northup y col. (2008) sugirieron la presencia de actinobacterias en un tubo de lava de EE.UU. (Tabla 1.1) tras llevar a cabo un análisis molecular filogenético y realizar observaciones mediante Microscopio Electrónico de Barrido, poniendo de manifiesto otros filos bacterianos como Chloroflexi, Verrucomicrobia y Proteobacteria. Resultados similares fueron obtenidos por Garcia y col. (2009), que identificaron el filo Actinobacteria en cinco de los seis tubos de lava muestreados, dominando sobre el resto de la población bacteriana. Al igual que Northup y col. (2008), también identificaron los filos Chloroflexi, Verrucomicrobia y Proteobacteria, engrosando la lista de filos bacterianos identificados en tubos de lava con otros nuevos: Acidobacteria, Nitrospirae, Cyanobacteria, Firmicutes, Gemmatimonadetes, Planctomycetes, Bacteroidetes, y Deinococcus-Thermus. Estos últimos filos generalmente son minoritarios en cuevas respecto a otros más abundantes como Actinobacteria y Proteobacteria, pudiendo ser identificados con mayor facilidad gracias a las técnicas moleculares (Barton y Jurado, 2007; Lee y col., 2012; Pašić y col., 2010). Los filos Acidobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, y Cyanobacteria también han sido localizados en otra clase de terrenos volcánicos en Hawái (Gomez-Alvarez y col., 2007).

Una vez se hubieron obtenido suficientes resultados por los diferentes autores, comenzaron a llevarse a cabo estudios microbiológicos comparativos entre tubos de lava de diversas partes del mundo. Moya y col., (2009) compararon las comunidades microbianas de tubos de lava de Nuevo México (EE.UU.) (Tabla 1.1) con las encontradas por Garcia y col. (2009) en Hawái, deduciendo que existía una diversidad combinada que abarcaba especialmente los filos bacterianos más abundantes de Actinobacteria, Acidobacteria y Gammaproteobacteria, pero concluyendo que los tubos de lava hawaianos eran más ricos en vida bacteriana. Otros estudios compararon

los tubos de lava de Azores con los de Hawái, como el de Hathaway (2010), que aunque identificó los mismos filos hallados hasta el momento por otros autores e idénticos en ambas localizaciones, llegó más allá al comparar a nivel de especie, encontrando diferencias significativas que atribuyó a la distinta composición química de la lava subyacente. Además, fue el primer estudio en demostrar la presencia de los genes *nifH* (fijación de nitrógeno) y *amoA* (oxidación de amonio) en tubos de lava, hecho que había sido sugerido anteriormente por otros autores (García y col., 2009; Moya y col., 2009; Snider y col., 2009). Estos resultados fueron más tarde ampliados y publicados en Hathaway y col. (2014a, 2014b).

Uno de los mayores esfuerzos de secuenciación para conocer con mayor profundidad la diversidad de actinobacterias en ambientes volcánicos hasta la fecha fue el llevado a cabo por Riquelme y col. (2015), en el que se empleó tanto secuenciación Sanger como pirosecuenciación 454 en muestras de tubos de lava de cuatro puntos del planeta (Tabla 1.1). La diversidad correspondió en su mayoría con el orden *Actinomycetales*, pero se consiguieron encontrar nuevos órdenes como *Euzebyales* y *Gaiellales*. Aportaron tres órdenes que nunca antes habían sido descritos en los tubos de lava de las Azores, correspondientes a *Rubrobacterales*, *Solirubrobacterales*, y *Coriobacteriales*. Un alto porcentaje de los clones encontrados poseían menos del 97% de similitud con secuencias conocidas, apoyando la idea de que los tubos de lava son una fuente importante de bacterias aún desconocidas.

El Microscopio Electrónico de Barrido es una tecnología muy empleada en el estudio de los biofilms de los tubos de lava. Precisamente con este equipo, Melim y col. (2008) identificaron los enigmáticos filamentos reticulados en muestras tomadas en un tubo de lava en Cabo Verde. Posteriormente, García y col., (2009) y Northup y col. (2011) los encontraron en los biofilms de tubos de lava de Hawái (Tabla 1.1). Miller y col. (2014b) los hallaron asociados con coraloideos en el tubo de lava Ana Heva en la Isla de Pascua (Chile), manifestándose así su ubicuidad.

Aunque las investigaciones sobre minerales secundarios en cuevas volcánicas también son menos numerosas, por haber sido considerados los tubos de lava de poco interés desde el punto de vista mineralógico (Forti, 2005), la diversidad de minerales observados es sorprendentemente amplia (Hill y Forti, 1997; Forti, 2000). La razón de esta diversidad mineralógica radica en la variedad de entornos volcánicos, cada uno con un conjunto único de condiciones para la deposición de minerales (Forti, 2005). Los tubos de lava son ricos en silicatos, y especialmente en ópalo (sílice hidratada), el cual es frecuentemente hallado en espeleotemas de tipo coraloide (Hill y Forti, 1997). La calcita es menos abundante en este caso, pero puede formar parte a su vez de coraloideos, coberturas en la roca y moonmilk (Hill y Forti, 1997; Polyak y Provencio, 2006). También es posible advertir depósitos de ferromanganeso en dichos ambientes (Northup y col., 2003).

Es factible afirmar que los espeleotemas de esta clase de cuevas son generalmente pequeñas formaciones, debido a la baja velocidad de disolución de la roca silíceo (White, 2010). A causa de ello, la catálisis microbiana es frecuente en la precipitación de los espeleotemas de silicato y minerales silíceos. Ejemplos de que los microorganismos pueden contribuir a la formación, remodelación y disolución de las rocas basálticas que forman los tubos de lava los tenemos en los propios coraloides, a los que se les ha asignado una generación mediada microbiológicamente en diversas ocasiones (Aubrecht y col., 2008; Urbani y col., 2005). También se han descrito procesos catalizados biológicamente que involucran a la sílice en tubos de lava (Kashima y col., 1987). Northup y col., (2011) apoyaron esta hipótesis en el estudio exhaustivo que llevaron a cabo, combinando el microscopio electrónico de barrido con técnicas moleculares, sobre muestras minerales de tubos de lava de diferentes condiciones climáticas: tropicales (Hawái), templadas (Azores) y más áridas (Nuevo México), demostrando que los espeleotemas que parecían puramente inorgánicos en realidad contenían abundantes comunidades microbianas. Por su parte, De los Ríos y col. (2011) investigaron con técnicas microscópicas de alta resolución las interrelaciones entre unos precipitados minerales, de silicio y ferrihidrita, y los microorganismos asociados, atribuyendo a los géneros bacterianos *Leptothrix* y *Gallionella* papeles importantes en la biomineralización de los espeleotemas.

Además de la materia orgánica y las raíces de las plantas que penetran en los tubos de lava, el hierro, el azufre y el manganeso son asimismo fuentes de energía recurrentes para los microorganismos quimiolitótrofos capaces de desarrollarse en esta clase de ambientes subterráneos (Gabriel y Northup, 2013; Moya y col., 2009). Por ejemplo, Popa y col. (2012) aislaron la cepa *Pseudomonas* sp. HerB, una bacteria quimiolitótrofa oxidante de hierro que emplea el mineral de olivino (silicato de hierro y magnesio) como su única fuente de energía en condiciones pobres de oxígeno. En diversos ambientes volcánicos se han descubierto nuevas bacterias quimiolitótrofas (Gomez-Alvarez y col., 2007; King, 2007; Stott y col., 2008).

Por estos motivos, los estudios están empezando a prestar más atención a la microbiota existente en los tubos de lava y cuevas basálticas, como una manera de evaluar ambientes con interés desde el punto de vista de la astrobiología (Northup y col., 2011).

1.5 IMPLICACIONES ASTROBIOLÓGICAS

Los ambientes subterráneos sirven de modelos para el estudio de sistemas quimioautotróficos, vida anaerobia y de microorganismos terrestres adaptados a condiciones extremas de supervivencia, con importancia crucial para la ecología de la superficie (acuíferos, minería, recursos energéticos, gestión de residuos, etc.) (Engel y col., 2008). Sin embargo, este hecho no se aplica únicamente a la Tierra: los biofilms microbianos de las cuevas son sistemas modelo muy interesantes para la

Astrobiología, especialmente los microorganismos quimiolitótrofos, que apoyan la idea de la existencia de vida microscópica en otros planetas (Northup y col., 2011).

Al realizar la comparación de algunas características entre la Tierra y el subsuelo de Marte, pueden hallarse similitudes remarcables. Las cuevas terrestres son ambientes extremos y singulares con condiciones físico químicas estables, que promueven la precipitación de minerales secundarios y el crecimiento microbiano, como hemos visto a lo largo de esta introducción. Esta combinación contribuye a la formación y conservación de firmas mineralógicas de vida (“biosignatures” en inglés), o rastros de vida, preservadas en el registro geológico (Léveillé y Datta, 2010). Por otra parte, el subsuelo de Marte está protegido frente a las inhóspitas condiciones de la superficie planetaria: radiaciones ultravioleta e ionizantes, temperaturas extremas, vientos muy fuertes, grandes tormentas de polvo, etc. (Dartnell y col., 2007). Además, la Administración Nacional de la Aeronáutica y del Espacio (más conocida como NASA) ha descubierto recientemente evidencias de la presencia de agua en estado líquido en Marte (<https://www.nasa.gov/press-release/nasa-confirms-evidence-that-liquid-water-flows-on-today-s-mars>). Todas estas razones llevan a pensar que no es imposible que la vida exista en el Planeta Rojo. En un principio, los microorganismos tienen más posibilidades que los organismos pluricelulares de poder habitar en Marte, debido a la escasa compatibilidad de la vida tal y como la conocemos con las inhóspitas condiciones atmosféricas marcianas. Podría ser factible que microorganismos quimioautótrofos pudieran sobrevivir bajo la superficie de Marte e incluso que huellas de vida pasada pudieran estar preservadas como microfósiles (Boston y col., 1992).

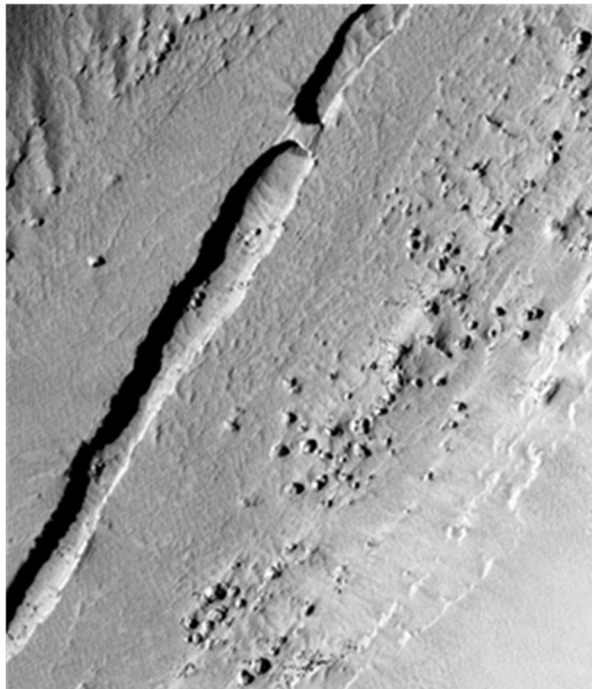


Figura 1.6 Imagen de un conducto similar a un canal hueco en la región de Tartarus Colle de Marte. Un tramo del canal posee un techo intacto, hecho que indica que en realidad se trata de un tubo de lava (Keszthelyi y col., 2008). Fuente: NASA/JPL/University of Arizona.

Aunque todas las cuevas terrestres comparten estas características, los tubos de lava son ambientes especialmente interesantes para los estudios astrobiológicos, debido a que en Marte se han descrito actividades volcánicas y también tubos de lava, por lo que son ambientes subterráneos susceptibles de poder usarse para estudios comparativos (Greely y Spudis, 1981). Muchos investigadores han aportado evidencias de la existencia de tubos de lava en Marte (Keszthelyi y col., 2008; Riedel y Sakimoto, 2002) y superficies colapsadas que forman depresiones alargadas del terreno (Figura 1.6). La misma clase de tubos son bien conocidos en la Tierra e incluso en la Luna (Greely, 1971).

Por todos estos motivos, los tubos de lava son una oportunidad para comprender mejor la biodiversidad y los orígenes de la vida, tanto en la Tierra como en otros planetas. La presencia de microorganismos que habitan en estos ambientes extremos y de rastros de vida primitiva se deben considerar en la búsqueda de vida en Marte (Rasmussen y col., 2009).

1.6 CONTEXTO DE LA TESIS

Los estudios de ecología microbiana de los ambientes subterráneos no son tan numerosos como los que se llevan a cabo en otro tipo de ambientes, lo cual puede ser atribuido por una parte a la dificultad en el acceso a las cuevas y por otra parte a la dificultad intrínseca en la distinción de procesos biológicos de los químicos. Las principales evidencias de la participación microbiana en el depósito de espeleotemas derivan de técnicas microscópicas limitadas y cultivos de enriquecimiento sin poder reproducir las condiciones ambientales (Northup y col., 1997).

A pesar de que los mecanismos de biomineralización han sido contemplados en diversas revisiones (Lowenstam, 1981; Lowenstam y Weiner, 1989; Mann, 2001; Weiner y Dove, 2003), realmente aún distan de estar totalmente investigados y comprendidos para la mayor parte de las especies, al igual que aspectos como la especificidad y el control genético de los diversos mecanismos, la estabilidad de los biominerales y la biomineralización bajo condiciones de oxidación (Benzerara y col., 2011).

En general, el estudio de los microorganismos resulta un proceso complejo de por sí. Todos los métodos de cultivo convencionales poseen la desventaja de que sólo una pequeña proporción presente en una comunidad microbiana es cultivable en condiciones de laboratorio (Giovannoni y col., 1990; Ward y col. 1990). Así, sólo las llamadas bacterias cultivables pueden ser estudiadas, por lo que hay un gran número de especies en diferentes ambientes que actualmente no pueden analizarse con los métodos clásicos (Pedersen, 1993). Se estima que únicamente el 0,1% de todos los microorganismos pueden cultivarse mediante las técnicas actuales (Amann y col., 1995).

Los microorganismos involucrados en procesos de biomineralización concretamente presentan problemas para ser aislados, al tratarse en muchos casos de microorganismos de crecimiento lento, y también a la hora de detectar sus secuencias obtenidas con técnicas moleculares (Takashima y col., 2008; Bruun y col., 2010). Los filamentos reticulados son un claro ejemplo de este problema, ya que su aislamiento se ha perseguido durante años sin éxito. Debido a que las técnicas de cultivo son esenciales para una evaluación completa de las comunidades microbianas presentes en una muestra ambiental, son necesarias técnicas adicionales para lograr su aislamiento. Por ejemplo, el aislamiento de microorganismos oxidantes de Mn(II) permite la caracterización de mecanismos de oxidación del manganeso, así como el descubrimiento de bacterias con rasgos distintivos (Toner y col., 2005; Miyata y col., 2006; Johnson y Tebo, 2008). El aislamiento de microorganismos oxidantes de Mn(II) propios de cuevas, seguido de la producción de óxidos de Mn en el laboratorio, es necesario para comprender el mecanismo involucrado en la oxidación microbiana (Miller y col., 2013).

Los importantes avances en el campo de la biología molecular han propuesto una alternativa al cultivo de microorganismos (Northup y col., 1997), de forma que se imponen cada vez más dichas técnicas. El análisis de las genotecas de clones del gen ARNr 16S aporta conocimiento sobre la diversidad filogenética y, mediante el análisis del ARN presente en la muestra, se puede conocer el componente activo de la misma (Martin-Sanchez y col., 2012). La información obtenida del ADN no siempre es concluyente, surgiendo la necesidad analizar a su vez el ARN. Este tipo de discriminación no se lleva a cabo en la mayoría de los estudios que aparecen en la literatura científica.

La conjunción de diversas técnicas de detección de microorganismos resulta muy interesante, ya que ayuda a compensar las limitaciones individuales, pudiendo obtenerse una visión más completa de la realidad (Portillo y col., 2008; De Leo y col., 2012).

Por otra parte, para el estudio de las interacciones microbio-mineral, ha sido de suma importancia el empleo de diversas técnicas, todas ellas con sus pros y sus contras. Entre ellas, el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) (McLean y col., 2000; Geesey y col., 2008) es francamente útil, pero la relación espacial de la interfaz microbio-mineral para estos estudios puede no preservarse intacta, en parte debido a la preparación necesaria de la muestra para las observaciones convencionales con este microscopio (Dong, 2010). También, el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) es una técnica muy usada para estudiar la morfología del moonmilk y otros minerales (Shopov y Hill, 1997), con el inconveniente de que los haces de electrones descomponen muchos minerales de cuevas además de ser un método difícil, caro y lento.

Todas las problemáticas mencionadas han alentado el desarrollo de esta tesis con el objetivo de aportar un mayor conocimiento en estos campos de estudio. El análisis de las comunidades microbianas, su papel en la biomineralización así como en las interacciones geomicrobiológicas puede ayudar a entender los pasos de la colonización, la diversidad microbiana en los ambientes subterráneos, la diversidad de biominerales y los diversos mecanismos de biomineralización.

1.7 OBJETIVOS DE LA TESIS

La presente tesis doctoral representa un trabajo multidisciplinar, donde confluyen diversas especialidades biológicas, geoquímicas y mineralógicas, mediante la realización de un estudio geomicrobiológico exhaustivo de los ambientes de estudio. Los objetivos específicos planteados son los siguientes:

1. Conocer la diversidad de comunidades microbianas subterráneas asociadas a depósitos de minerales secundarios recogidos en minas de agua excavadas en granito y tubos de lava de diferentes localizaciones, concretamente: depósitos negros y moonmilk de túnel de granito de Paranhos (Oporto, Portugal), depósitos negros de la Mina das Aveleiras (Braga, Portugal), depósitos negros y mucolitos de tubos de lava de las Islas Canarias (España) y moonmilk y coraloides de tubos de lava de las Islas Galápagos (Ecuador).

2. Profundizar en el origen y la composición de los espeleotemas de estos ambientes subterráneos.

3. Profundizar fundamentalmente en los microorganismos implicados en procesos de biomineralización.

4. Contribuir a la resolución del origen, naturaleza y composición de los filamentos reticulados que aparecen en cuevas, partiendo de la hipótesis de que es una bacteria.

1.8 ESTRATEGIA DE TRABAJO

En el programa de trabajo de esta tesis se han analizado muestras de espeleotemas de depósitos negros y moonmilk, coraloides y mucolitos de ambientes subterráneos, específicamente de minas de agua excavadas en granito en las ciudades de Oporto y Braga (Portugal), así como tubos de lava de las Islas Canarias (España) e Islas Galápagos (Ecuador), en los que se ha constatado además la presencia de los enigmáticos filamentos reticulados.

Para llevar a cabo el estudio geomicrobiológico exhaustivo de depósitos de minerales secundarios propuesto en este proyecto de tesis, se ha empleado un abanico de:

- ❖ Técnicas habituales en microbiología: cultivo, aislamiento e identificación.
- ❖ Técnicas de biología molecular con caracterización de las comunidades mediante extracción de ADN, PCR, clonaje, DGGE e identificación de secuencias.

- ❖ Técnicas para la caracterización morfológica y mineralógica de las muestras de depósitos de minerales secundarios, mediante microscopía electrónica (FESEM, TEM), y métodos de caracterización de minerales secundarios (micro-Raman, FTIR, FESEM-EDS, XRD y XRF) que contaron con la colaboración de otros investigadores.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MUESTRAS ESTUDIADAS

En esta Tesis Doctoral se aborda el estudio microbiológico de diversas minas de agua excavadas en granito y tubos de lava que presentan distintos tipos de espeleotemas en su interior. Se estudiaron principalmente cavidades subterráneas europeas, junto a otras en Ecuador. Concretamente, estas localizaciones correspondieron a dos minas de agua situadas en Oporto y Braga (Portugal), dos tubos de lava de las Islas Canarias (España) y dos tubos de lava de las Islas Galápagos (Ecuador).

Bajo la ciudad de Oporto (Portugal) se ubica el denominado túnel de Paranhos, galería de una de las principales minas de agua de la ciudad. De esta cavidad se analizaron depósitos negros (dos muestras denominadas 0212T2A y 0313T2A) y moonmilk (una muestra denominada 0710T2-6F), los cuales recubrían sus paredes de granito.

En un municipio cercano a la ciudad de Braga (Portugal) se encuentra la Mina das Aveleiras, mina de agua de alto valor patrimonial, de la cual se tomaron depósitos negros que también se hallaban sobre las paredes de las galerías. Esta muestra fue denominada 0710BR-6F.

En la isla de La Palma (Islas Canarias), se localiza el tubo de lava de la Cueva del Llano de los Caños, del que se tomaron muestras de depósitos negros y mucolitos para su análisis microbiológico. La muestra de depósitos negros se denominó MZ04-1, mientras que MZ04-4 y MZ04-5 se asignaron a las dos muestras de mucolitos. Por otra parte, de otro tubo de lava en Gran Canaria (Islas Canarias) llamado Mina de los Cernícalos, se estudiaron también depósitos negros de una muestra denominada MNGC-1.

Por último, de unos tubos de lava ecuatorianos localizados en las Islas Galápagos se estudiaron dos clases de espeleotemas: moonmilk del tubo de lava de Bellavista y coraloides del tubo de lava Royal Palm, ambos situados en la Isla Santa Cruz. Estas muestras se denominaron Bella 1 y Royal 2, respectivamente.

Las muestras de espeleotemas estudiadas en esta Tesis Doctoral fueron tomadas en el periodo comprendido entre julio de 2010 y marzo de 2015. En todos los casos, se recogieron con la ayuda de un bisturí estéril, raspando directamente sobre los depósitos de minerales secundarios que se deseaba analizar en las distintas áreas seleccionadas para cada una de las cavidades subterráneas objeto de estudio. A continuación, se depositaron en tubos de microcentrífuga estériles de 1,5 mL.

Las muestras destinadas al cultivo de microorganismos se mantuvieron en hielo hasta llegar al laboratorio y se procesaron directamente. Las muestras destinadas a los análisis de los ácidos nucleicos se mantuvieron a 4°C durante su transporte y

posteriormente se conservaron a -80°C en congelador (Revco Elite Plus, Thermo Scientific, EE.UU.) en el caso de que no fueran a procesarse de forma inmediata.

Las muestras se analizaron simultáneamente mediante diferentes técnicas moleculares y técnicas mineralógicas. Se identificaron y caracterizaron las comunidades microbianas existentes y, por otra parte, también se caracterizaron los minerales presentes.

2.2 AISLAMIENTO, ENRIQUECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

2.2.1 MEDIOS DE CULTIVO

El cultivo y aislamiento de microorganismos se llevó a cabo en las muestras de depósitos negros recogidas en el túnel de Paranhos de Oporto y en todas las muestras recogidas de los tubos de lava de las Islas Canarias.

Inicialmente, a 2 g de cada muestra se le añadieron 30 mL de una solución de NaCl al 0,7% (p/v) en condiciones de esterilidad. En el caso de ser preciso, fue posteriormente sonicada durante 3 minutos en el baño de ultrasonidos Ultrasons 1L (JP Selecta, España), con el objetivo de romper las células microbianas con paredes mineralizadas, como los filamentos reticulados que pudieran encontrarse en las muestras, y así favorecer el proceso de extracción de ADN.

Las muestras se sembraron a continuación en una batería de medios de cultivo con diferentes composiciones, preparados en placas de Petri siguiendo protocolos estandarizados de microbiología. Dado que la mayoría de los microorganismos de cuevas son oligotróficos o quimiolitotróficos con requerimientos nutricionales específicos (Northup y Lavoie, 2001), se diseñaron medios de cultivos adecuados en función de las características de las cavidades subterráneas, con el objetivo de aislar e identificar todas las bacterias cultivables posibles.

Los medios de cultivo en los que se sembró la muestra de depósitos negros de Paranhos 0212T2A fueron denominados: M1-M9 (Tabla 2.1). Además, con el propósito de identificar bacterias capaces de oxidar manganeso y hierro, que pudieran estar implicadas en procesos de biomineralización, así como aquellas que dieran origen a los filamentos reticulados, se emplearon también los medios Rouf modificado (Rouf y Stokes, 1964), PC (Sly y col., 1990), *Leptothrix* (medio LMG 187) y un medio especialmente diseñado con tal fin denominado SED (Tabla 2.1). Estos últimos poseen composiciones ricas en hierro y manganeso.

Según la experiencia que se obtuvo en esta muestra, para la muestra de depósitos negros 0313T2A se volvieron a emplear dos medios que dieron buenos resultados en el crecimiento de bacterias asociadas a óxidos de manganeso en la

muestra recogida en el año 2012: M7 y Rouf modificado. En este caso, la muestra se sembró también en otros tres medios específicos para lograr el mismo fin: AY suplementado con MnSO_4 1 mM (Miyata y col., 2004), FeTSB (Johnson y col., 1987) y Burk's nitrogen-free modificado (Carmichael y col., 2013). Todos los medios se inocularon a razón de 100 μL de muestra por placa.

En el caso de las muestras de las Islas Canarias, se utilizaron únicamente los medios M7, Rouf modificado, AY suplementado con MnSO_4 1 mM, Burk's nitrogen-free modificado y *Leptothrix* (medio LMG 187), en base a los resultados obtenidos para las muestras anteriores.

También se realizaron cultivos de enriquecimiento, preparando los mismos medios que se han indicado anteriormente en forma líquida, sin agar. Para ello, se inoculó 1 mL de la suspensión de la muestra correspondiente en 100 mL de medio líquido. Además, se realizó un duplicado de los medios líquidos M7 y Rouf modificado en frascos de vidrio Pyrex de 100 mL conteniendo en su interior dos portaobjetos estériles de vidrio en posición vertical, puesto que se sabe que la precipitación del manganeso por parte de algunas bacterias se ve incrementada si previamente se adhieren a superficies cristalinas (Nealson y Ford, 1980).

Tanto las placas como los matraces, una vez sembrados, fueron incubados en un rango de 18°C-23°C, similar a la temperatura media que existe a lo largo del año en los ambientes de estudio. En el caso del túnel de Paranhos por ejemplo, dicha temperatura ronda los 18°C (Fernandez-Cortes y col., 2014). Los matraces se mantuvieron sin agitación y en oscuridad. Permanecieron en este estado durante dos meses como mínimo, para permitir también el desarrollo de las bacterias de crecimiento lento.

Tras producirse el crecimiento de las colonias de las muestras naturales (Figura 2.1 A y B), se fueron aislando por separado, repitiendo el proceso de aislamiento tantas veces como fuera necesario hasta obtener un único tipo de colonia por placa. En un principio, se aislaron todas aquellas colonias que presentaban morfologías diferentes, observándose aspectos como el color, el tamaño o la textura (rugosa, incrustada en el agar, etc.), poniendo especial atención a las que presentaban una coloración marrón o negra, lo que pudiera significar la presencia de óxidos de manganeso o de hierro.

Tabla 2.1 Composiciones de los medios de cultivo diseñados para la siembra de las muestras de depósitos negros del túnel de Oporto (0212T2A y 0313T2A), con indicación del pH al que han de prepararse.

Medio de cultivo	Composición								Añadir filtrada tras el autoclavado	pH
M1	Agar marino 55,1 g	NH ₄ NO ₃ 1 g	KH ₂ PO ₄ 0,5 g	Acetato de Na 0,5 g	FeSO ₄ 2,8 mg					8
M2	Agar marino 55,1 g	NH ₄ NO ₃ 0,1 g	Triptona 5 g	Acetato de Na 0,5 g	Extracto de levadura 1 g					7,5
M3	Caldo triptona-soja 3 g									8
M4	NaNO ₂ 0,5g	CaCO ₃ 0,007 g	NaCl 0,5 g	MgCl ₂ · 6 H ₂ O 0,05 g	KH ₂ PO ₄ 0,15 g				Solución de micronutrientes BG-11 1 mL	8,6
M5	Glucosa 10 g	CaCO ₃ 1 g	NaCl 0,2 g	KH ₂ PO ₄ 1 g	FeSO ₄ 0,1 g	MgSO ₄ 0,2 g	Na ₂ MoO ₄ 0,005 g			7
M6	FeSO ₄ 0,001 g	K ₂ HPO ₄ 0,854 g	KH ₂ PO ₄ 0,694 g	Acetato de Na 100 mg	CaCl ₂ 0,176 g	MgSO ₄ 0,460 g	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1,234 g		Solución de micronutrientes BG-11 1 mL	8
M6B	Misma composición que M6					Ácido tánico 100 mg				8
M7	MnSO ₄ 50 mg	Na ₂ HPO ₄ 30 mg	FeSO ₄ 50 mg	Acetato de Na 250 mg	CaCl ₂ 20 mg	MgSO ₄ 60 mg	(NH ₄) ₂ SO ₄ 240 mg	HEPES 2,383 g		7
M8	MnSO ₄ 50 mg	KH ₂ PO ₄ 50 mg	FeSO ₄ 50 mg	NH ₄ NO ₃ 50 mg						7
M9	Biomasa bacteriana 40 mg									7
SED	Suspensión de depósitos negros recogidos en la pared del túnel de Oporto en 2011 100 ml									—

Notas: Las cantidades hacen referencia a 1 L de medio de cultivo. Todos los medios fueron preparados en agua destilada, excepto M8 y M9 que se prepararon en agua corriente, y fueron autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Para las versiones sólidas, se añadieron 20 g/L de agar. En color naranja se indican aquellos compuestos que aportan manganeso o hierro al medio de cultivo. La solución de micronutrientes BG-11 fue descrita por Rippka y col. (1979).

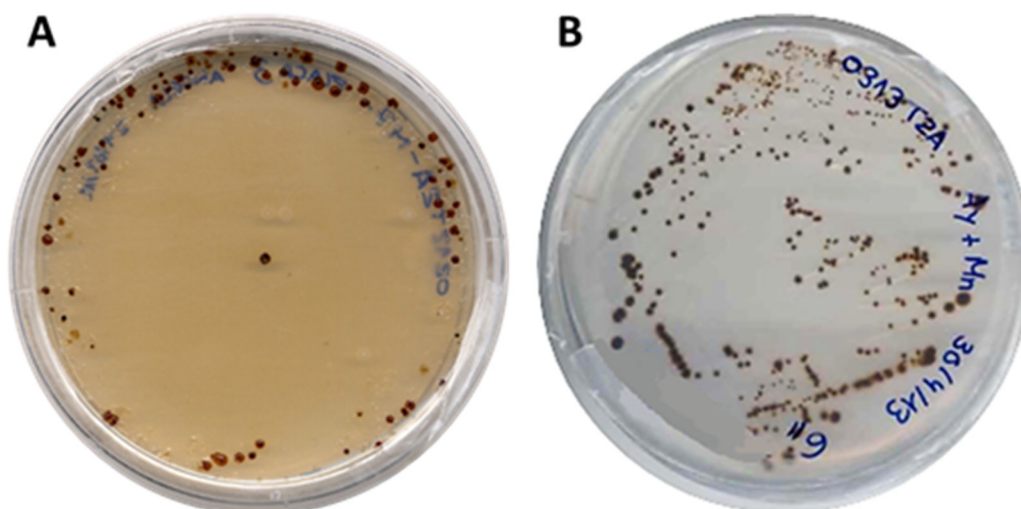


Figura 2.1 Placas de Petri que muestran colonias bacterianas obtenidas de las muestras de depósitos negros del túnel de Paranhos. A. Placa de medio Rouf modificado sembrada con muestra 0212T2A. B. Placa de medio Ay+Mn sembrada con muestra 0313T2A.

Una vez se confirmaba la pureza de todos los cultivos, eran conservados a -80°C en glicerol al 20% (p/v) o en crioviales Microbank™ (Prolab-Diagnostics, Canadá) donde pueden permanecer durante años asegurando la supervivencia de los cultivos.

Los cultivos de enriquecimiento también se resembraron en sucesivas ocasiones, traspasando 1 mL de cultivo a otros 100 mL de medio líquido, con el objetivo de valorar la viabilidad y el posible crecimiento de los filamentos reticulados.

A los cultivos de enriquecimiento de las muestras de depósitos negros de Oporto se les midió el pH semanalmente, para conocer su evolución con el paso del tiempo, mediante un pH-metro Basic 20 con un electrodo de pH 50-12 en disolución electrolítica CRISOLYT-A (CRISON, España). Además, en el Instituto Superior Técnico de la Universidad de Lisboa (IST-UL), Portugal, se realizaron medidas del potencial de óxido reducción (redox) mediante un electrodo indicador de platino, teniendo como referencia un electrodo de Ag/AgCl en electrolito KCl 3 M saturado.

Por otra parte, se solicitó a la colección de microorganismos BCCM/LMG (Universidad de Gante, Bélgica) la cepa *Leptothrix cholodnii* LMG 8142/ATCC 51168/SP-6, anteriormente denominada *Leptothrix discophora* SP-6 (Spring y col., 1996). Fue proporcionada por la colección en medio LMG 187, en el que fue mantenida mediante resiembras sucesivas. Esta cepa fue aislada de una corriente de agua con hierro y poseía la capacidad de formar una estructura extracelular de forma tubular, denominada vaina, característica de algunas especies pertenecientes al género *Leptothrix* sp., siendo la única especie conocida de dicho género capaz de mantenerla bajo condiciones de laboratorio (Emerson y Ghiorse, 1992). Su semejanza con la estructura observada en los filamentos reticulados además de la actividad oxidante de

manganeso asociada con la vaina permitió la realización de pruebas comparativas con las cepas aisladas de las muestras de depósitos negros de Oporto, en este caso mediante cultivos en placa y de enriquecimiento, DGGE y como control positivo en el estudio del gen *mofA*.

2.2.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO DE CEPAS BACTERIANAS

Para llevar a cabo la extracción del ADN genómico de las bacterias aisladas, se comenzó tomando una cantidad suficiente de biomasa con el asa de siembra y transfiriéndola a 100 μ L de agua estéril libre de ácidos nucleicos y nucleasas (Water for Embryo Transfer, Sigma-Aldrich, EE.UU.) o de tampón Tris-NaCl-EDTA (TNE) (10 mM Tris, 28 mM NaCl, 1 mM EDTA; pH 8) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Una vez resuspendida, se sometió a continuación a tres ciclos de congelación/descongelación. Estos choques térmicos consistieron en pasar de -80°C a un calentamiento a 65°C. Para finalizar, se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante obtenido, que contenía el ADN, se recogió y se conservó a -20°C, una vez se hubo medido su concentración.

Para la cuantificación del ADN extraído se empleó un equipo Nanodrop ND-1000 (Nanodrop, EE.UU.) con el programa ND-1000 versión 3.8.1. Mediante longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm, se evaluó la calidad del ADN calculando los ratios A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} .

La absorbancia mínima y máxima para el ADN es 230 nm y 260 nm, respectivamente (Kalb y Bernlohr, 1977), mientras que las proteínas absorben principalmente a 280 nm (Teare y col., 1997). Una razón A_{260}/A_{280} por encima de 1,8 para ADN y 2,0 para ARN corresponde a muestras puras, así como una razón A_{260}/A_{230} entre 2,0 y 2,2. Valores inferiores indican la presencia de proteínas u otros contaminantes (Teare y col., 1997).

2.2.3 AMPLIFICACIÓN DE ADN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Para lograr la identificación de las cepas bacterianas se llevó a cabo la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) del ARN ribosómico (ARNr) 16S. El análisis de dichos fragmentos es una técnica muy empleada en la taxonomía microbiana, ya que se aísla fácilmente y su tasa de cambio es baja en comparación con la del genoma en conjunto, resultando muy útil para establecer relaciones evolutivas (Stanier, 1992), por lo que existen bases de datos con gran cantidad de secuencias.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador FlexCycler (Analytik Jena AG, Alemania). Cada reacción de PCR se desarrolló en tubos de 0,2 mL. La mezcla

de reacción estuvo compuesta por 5 µL de tampón 10X BioTaq (Bioline, EE.UU.), 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 5 µL de una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTPs) (2 mM) (Invitrogen, EE. UU.), 0,5 µL de cada uno de los cebadores correspondientes F (“forward”) y R (“reverse”) (50 µM) (Invitrogen, EE.UU.) (Tabla 2.2), 0,25 µL de la ADN polimerasa BioTaq (5 U/µL) (Bioline, EE.UU.) y 5-20 ng de ADN molde. Se completó el volumen de la mezcla de reacción hasta un volumen final de 50 µL con agua estéril libre de ácidos nucleicos y nucleasas (Sigma-Aldrich, EE.UU.). En todos los casos se usaron controles positivos y negativos. Para aumentar la afinidad de la polimerasa por la cadena de ADN, se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) al 10% en una proporción de 4 µL de BSA / 1 mL de mezcla de reacción de PCR.

Tabla 2.2 Cebadores empleados para la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S.

Cebadores*	Secuencia	Referencia
616F	5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'	Zimmermann y col. (2005)
27F	5'-AGAGTTTGATCMTGCTCAG-3'	Weisburg y col. (1991)
1510R	5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'	Echigo y col. (2005)
1522R	5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'	Giovannoni (1991)
907R	5'-AATTCCTTTGAGTTT-3'	Weisburg y col. (1991)

* F (“forward”), se refiere al cebador directo; R (“reverse”) al cebador reverso. Los prefijos numéricos se refieren a la posición relativa en el gen del ARNr 16S del microorganismo utilizado como referencia, *Escherichia coli*.

El protocolo utilizado para la amplificación del ARNr 16S con las parejas de cebadores 616F/1510R, 616F/1522R y 27F/1510R consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos que comprendían 20 segundos de desnaturalización a 94°C, 20 segundos de anillamiento de oligonucleótidos a 55°C y 2 minutos de elongación a 72°C. Finalmente, tuvo lugar un ciclo de extensión a 72°C durante 2 minutos.

Por otra parte, el protocolo para la amplificación del ARNr 16S con las parejas de cebadores 616F/907R y 27F/907R consistió en 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C; 30 ciclos compuestos por 15 segundos a 94°C, 15 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C; seguidos de 10 minutos de extensión final a 72°C.

Para conocer si la amplificación de cada muestra analizada había sido efectiva, se llevó a cabo una comprobación mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% (p/v) con tampón TAE 0,5X (Tris 20 mM, ácido acético glacial 10 mM, EDTA 0,5 mM). En cada pocillo del gel se cargaron 2 µL de SYBR Green I (Molecular Probes, EE.UU.) y 5 µL de producto de PCR. El SYBR Green I emite fluorescencia al unirse con el ADN amplificado. La electroforesis se desarrolló en un equipo BioRad Power-Pac Basic (BioRad, EE.UU.), conteniendo el tampón TAE 0,5X a pH 8,2, con una fuente de

alimentación EPS 600 (Amersham Biosciences, EE.UU.) a 90 voltios durante 20 minutos. Cada fragmento de ADN migra en el gel en función de los pares de bases (pb) del producto de PCR, siendo alrededor de 1500 pb para las parejas de cebadores 616F/1510R, 616F/1522R y 27F/1510R; y de 900 pb para las parejas 616F/907R y 27F/907R.

Los geles se observaron con un transiluminador ECX-26.MX (Vilber Lourmat, Francia), capaz de emitir luz ultravioleta a una longitud de onda de 312 nm. Los geles se fotografiaron con una cámara digital Kodak Edas DC290 utilizando el programa Kodak 1D Image Analysis Software (Kodak, EE.UU.).

2.2.4 ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE ADN

Los productos de PCR amplificados fueron secuenciados por MacroGen Europe Sequencing Services (Países Bajos). Las secuencias generadas automáticamente por el secuenciador se editaron utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.5.3 (Hall, 1999), el cual permite además comprobar la calidad de las mismas.

Se comprobó la similitud de las secuencias obtenidas con otras ya descritas hasta el momento empleando la base de datos EzTaxon-e (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>; Chun y col., 2007; Kim y col., 2012), la cual incluye únicamente aquellas secuencias taxonómicamente relevantes de las cepas tipo bacterianas con nombres válidos, empleando un algoritmo de alineamiento global (Myers y Miller, 1988).

Mediante el programa MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6.0; Tamura y col., 2013), se comprobó la similitud que presentaban entre sí las secuencias de las cepas con la misma afiliación obtenidas de las muestras de los depósitos negros para, en el caso de ser mayor o igual al 99%, poder agruparlas en una única especie.

2.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE LAS MUESTRAS NATURALES Y DE LOS CULTIVOS DE ENRIQUECIMIENTO

2.3.1 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

A lo largo de esta tesis se aplicaron tres métodos diferentes para la extracción de los ácidos nucleicos. Para todas las muestras naturales se estudiaron los microorganismos totales, empleándose el kit de extracción de ADN FastDNA Spin® Kit for soil (MP Biomedicals, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit también fue empleado para extraer el ADN de los cultivos de enriquecimiento en medio Rouf modificado de las muestras de depósitos negros recogidas en los diferentes tubos de lava y minas de agua.

Para aquellas muestras naturales y los cultivos de enriquecimiento que requirieran un análisis de los microorganismos presentes totales y metabólicamente activos, se siguieron dos métodos más para la extracción de los ácidos nucleicos.

El primero de estos dos métodos de extracción fue descrito por Griffiths y col. (2000), con algunas modificaciones, permitiendo el análisis en paralelo del ADN y ARN. Para evitar la degradación del ARN, durante todo el proceso de extracción las muestras se mantuvieron siempre en hielo y se utilizó también una centrifuga refrigerada a 4°C. Se partió de unos 500 mg de cada muestra recogida en tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, a los que se añadieron unas perlas de vidrio de 3 y 5 mm de diámetro (Merck, Alemania), 500 µL de tampón de extracción CTAB (Tris 100 mM, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, bromuro de hexadeciltrimetilamonio [CTAB] 2%; pH 8) y 500 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, pH 7.8-8.2) equilibrado a 4°C para la purificación de los ácidos nucleicos. A continuación, la mezcla se homogeneizó utilizando un equipo FastPrep 24 (MP Biomedicals, Francia), aplicando un ciclo de 30 segundos a una velocidad de 5,5 m/s. Se centrifugó a 12.500 rpm durante 5 minutos, y el sobrenadante fue sometido a una purificación adicional con 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). La mezcla se agitó durante 5-10 segundos y se repitió la centrifugación a 12.500 rpm durante 5 min. Se recogió el sobrenadante y en los casos en que éste era demasiado turbio se repitió el proceso de extracción con cloroformo.

La precipitación de los ácidos nucleicos se realizó añadiendo 50 µL de acetato de sodio 3 M y 500 µL de isopropanol frío (-20°C) a cada muestra. Con el objetivo de favorecer la precipitación, se agitó suavemente por inversión y se mantuvieron a -20°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó durante 30 min a 12.500 rpm, descartándose el sobrenadante en este caso y añadiendo 1 mL de etanol 70% a -20°C para lavar el precipitado. Se dejó secar a temperatura ambiente y se centrifugó nuevamente a 12.500 rpm durante 5 minutos, descartándose también el sobrenadante. Por último, mediante un pulso de centrifugación de 10 segundos, ya a temperatura ambiente, se eliminaron totalmente los restos de sobrenadante. Las muestras se dejaron secar al aire hasta que el etanol se hubo evaporado totalmente y los precipitados se resuspendieron en 50 µL de agua estéril libre de ácidos nucleicos y nucleasas (Sigma-Aldrich, EE.UU.). De estos 50 µL de ácidos nucleicos totales, 20 µL fueron conservados a -80°C para los análisis de ADN y con los otros 30 µL se continuó con el aislamiento del ARN. En primer lugar, se limpió el material de trabajo con el reactivo RNA Protect Bacteria Reagent (Quiagen, Alemania). Una vez realizado este paso, se procedió a eliminar el ADN llevando a cabo una digestión enzimática del mismo con el kit RNase-free DNase Set (Quiagen, Alemania). A los 30 µL de los ácidos nucleicos se les añadieron 10 µL de tampón salino del propio kit, 2,5 µL de la enzima ADNasa y 57,2 µL de agua ultra pura libre de ARNasa. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para que se produjera la reacción enzimática. A continuación, se purificó el ARN empleando el kit RNeasy MinElute Cleanup (Quiagen,

Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante y recuperando el ARN puro en 14 μL de agua ultra pura libre de ARNs. Para el análisis de las comunidades microbianas metabólicamente activas, presentes en el ARN, fue necesaria la síntesis del ADN complementario (ADNc). Este proceso de retro-transcripción se realizó en un termociclador iCycler Thermal Cycler (BioRad, EE.UU.). En primer lugar, en un tubo de 0,2 mL, se mezclaron: 1 μL de cebador reverso (2 μM) específico (1510R [Echigo y col., 2005] y 907R [Weisburg y col., 1991] para bacterias), 2 μL de ARN purificado, 0,8 μL de mezcla de desoxirribonucleótidos (12,5 μL) y 8,2 μL de agua estéril libre de ácidos nucleicos y nucleasas (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Después, se incubó durante 5 minutos a 65°C y posteriormente se añadieron 4 μL de tampón suministrado y 2 μL de ditiotreitól (DTT) 0.1 M (Invitrogen, EE.UU.). Se incubó nuevamente a 42°C durante 2 minutos. Se añadió 1 μL de la transcriptasa inversa (SuperScript II Reverse Transcriptase; Invitrogen, EE.UU.) a cada tubo, continuando con una incubación de las muestras a 42°C durante 50 minutos. Para finalizar, se incubó otros 15 minutos a 70°C. La concentración de los ácidos nucleicos extraídos de las muestras se midió de la manera especificada en el apartado 2.2.2 de este capítulo.

El segundo de los métodos de extracción para el estudio de los microorganismos metabólicamente activos fue únicamente aplicado a los cultivos de enriquecimiento de color negro en medio Rouf modificado de la muestra del túnel de Paranhos 0212T2A. Se llevó a cabo mediante el equipo PhotoActivation System for Tubes - PhAST Blue (GenIUL, España), siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 2.2). Este sistema, a través del uso de reactivos de intercalación fotoactivables junto a un proceso de fotoactivación con una fuente de luz LED ($\lambda = 464\text{-}476\text{ nm}$, 60 W), a temperatura ambiente durante 15 minutos, es capaz de neutralizar el ADN y ARN de los microorganismos muertos. Por tanto, las muestras tratadas con el sistema PhAST Blue permiten la detección de los ácidos nucleicos a partir de únicamente las células vivas. Tras estos pasos previos para eliminar los microorganismos no viables, se procedió de nuevo con la extracción de ADN mediante el kit ADN FastDNA Spin® Kit for soil (MP Biomedicals, Francia), de la manera especificada al inicio de este apartado, con la diferencia de que en este caso únicamente se obtuvo el ADN de las células metabólicamente activas.



Figura 2.2 PhotoActivation System for Tubes - PhAST Blue (GenIUL, España)

Todos estos métodos de extracción se llevaron a cabo con el objetivo de establecer comparaciones entre los resultados obtenidos por cada uno y valorar cuáles resultaban más convenientes para la metodología de trabajo de la tesis.

Tanto el ADN total como el ADN complementario, obtenido a partir del ARN, se utilizaron como molde en las reacciones de PCR. El ADN de todas las muestras naturales resultante de estas reacciones de amplificación, se utilizó para experimentos de clonación. En el caso de las muestras de depósitos negros de la mina de agua de Oporto y de las muestras de las Islas Canarias, también se empleó para electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) y otros estudios complementarios.

2.3.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En el análisis de las muestras naturales se llevaron a cabo diversas amplificaciones específicas, tanto del ADN total como del ADNc, para analizar distintas comunidades microbianas, siguiendo la metodología general explicada en el apartado 2.2.3 del presente capítulo.

En el caso de bacterias y arqueas se amplificó el gen ARNr 16S. Para las bacterias se emplearon los cebadores 616F (Zimmermann y col., 2005), 27F (Weisburg y col., 1991), 1510R (Echigo y col., 2005) y 907R (Weisburg y col., 1991), mediante las parejas 616F/907R y 27F/907R, amplificando aproximadamente 900 pares de bases (pb), y 616F/1510R y 27F/907R, alrededor de 1500 pb. Los protocolos utilizados para la amplificación del ARNr 16S con estos cebadores siguieron las condiciones especificadas en el apartado 2.2.3.

Para el estudio de los organismos eucariotas se amplificó el gen ARNr 18S (homólogo al 16S procariota) y las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer). Estas últimas son regiones no codificantes correspondientes a los espaciadores internos transcritos 1 y 2, situadas entre los genes ribosómicos 18S y 5.8S (ITS1), y entre 5.8S y 28S (ITS2), de longitud variable según el organismo, generalmente comprendida entre los 400 y 900 pb. Poseen un alto grado de variabilidad y se encuentran flanqueadas por secuencias altamente conservadas, lo que hace que sean útiles como marcadores en estudios filogenéticos. Por otra parte, desde un punto de vista metodológico, es relativamente fácil llevar a cabo su amplificación a partir de una pequeña cantidad de muestra debido a que están presentes en un elevado número de copias por célula, superior a 250 (Santamaria y col., 2012).

En el caso de arqueas se utilizó la pareja de cebadores específicos Arch109F (5'-ACK GCT CAG TAA CAC GT-3') y Arch915R (5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3') (Chan y col., 2005) (amplificando aproximadamente 800 pb). El protocolo utilizado para la amplificación del gen ARNr 16S con estos cebadores consistió en 5 minutos de desnaturalización inicial a 95°C; 25 ciclos compuestos por 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C y 3 minutos a 72°C; seguidos de 10 minutos de extensión final a 72°C.

Para los microorganismos eucariotas, se empleó la pareja de cebadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White y col., 1990) específica para hongos (amplificando del orden de 600-700 pb) y también la pareja EukA (5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3') y EukB (5'-TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC-3') (Diez y col., 2001) (unas 1700 pb). El protocolo utilizado para la amplificación de las regiones ITS consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos; seguido de 35 ciclos que comprendían 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C y 1 minuto a 72°C; con un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos. En cuanto al protocolo utilizado para la amplificación del gen del ARNr 18S con la pareja de cebadores EukA/EukB consistió en 2 minutos de desnaturalización inicial a 95°C; 35 ciclos compuestos por 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C y 1 minuto a 72°C; seguidos de 10 minutos de extensión final a 72°C.

2.3.3 PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Los productos amplificados por PCR de las muestras naturales se purificaron utilizando el kit comercial Jetquick PCR Product Purification Spin Kit (Genomed, Alemania), para eliminar los restos de cebadores, nucleótidos y enzimas, siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Se conservaron a -20°C hasta ser utilizados, según la muestra, para la construcción de genotecas, para electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE), o para ambos simultáneamente.

2.3.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE)

Los análisis de las comunidades microbianas de las muestras de depósitos negros del túnel de Paranhos (Oporto, Portugal) y de todas las muestras de los tubos de lava de las Islas Canarias, se realizaron mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) según el protocolo establecido por Muyzer y col. (1993), incluyendo algunas modificaciones.

Esta técnica ha sido muy empleada para la caracterización de las comunidades microbianas presentes en muestras naturales de diferentes orígenes, resultando útil en el estudio de la microbiota de ambientes oligotrofos como las cuevas. Permite separar los productos de PCR que tienen tamaños parecidos o idénticos, en base a las diferencias mínimas que presentan sus secuencias. Se ha demostrado incluso que esta técnica permite distinguir diferencias de tan sólo un nucleótido (Muyzer y col., 1993; Muyzer y Smalla, 1998).

La separación de los distintos fragmentos de ADN está basada en la reducción de su movilidad electroforética al desnaturalizarse parcialmente la doble cadena de ADN en un gel de poliacrilamida con un gradiente químico de urea y formamida. Por este motivo, es necesario que los productos de PCR que se analizan posean una cola rica en GC en alguno de los cebadores, hecho que aporta estabilidad a la doble cadena en el proceso de migración y evita su total desnaturalización. El resultado de la DGGE

es un patrón de bandas característico de las comunidades microbianas presentes en las muestras analizadas. En teoría, cada banda corresponde a un microorganismo diferente, aunque se ha comprobado que un mismo microorganismo puede generar más de una banda (Zijngel y col., 2006). Esto podría deberse a la variabilidad genética que presenten las distintas copias de la región analizada e incluso al tiempo de análisis, ya que si éste se aumenta también incrementa la probabilidad de encontrar más de una banda.

Antes de proceder con la electroforesis DGGE en sí, es necesario en primer lugar llevar a cabo una amplificación por PCR de las muestras a analizar con parejas de cebadores específicos, que añaden la cola GC a los productos finales del proceso de amplificación. Para el análisis de bacterias de las muestras naturales 0212T2A y 0313T2A se usó la pareja de cebadores 341F-GC (5' cola-GC CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') y 518R (5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (Muyzer y col., 1993) obteniendo un fragmento de aproximadamente 200 pares de bases. Las condiciones de la mezcla de reacción fueron las mismas que las empleadas para las amplificaciones descritas en el apartado 2.2.2. El protocolo de PCR utilizado en esta amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos; seguido de 35 ciclos que comprendían 15 segundos a 94°C, 15 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C; con un ciclo de extensión final a 72°C durante 30 minutos.

Las dimensiones de los geles de poliacrilamida fueron de 20 x 16 x 0,1 cm, que contenían un 8% (p/v) de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1) (BioRad, EE.UU.) en tampón TAE 0,5X (apartado 2.2.3), con un gradiente de agentes desnaturalizantes [urea 7 M, formamida desionizada 40% (v/v)] de 30-55%, que resultó ser el rango más adecuado para caracterizar las comunidades bacterianas (modificado de Muyzer y col., 1993). Para generar este gradiente, se prepararon de forma independiente dos soluciones de acrilamida con distintas concentraciones de agentes desnaturalizantes: Solución de Densidad Baja (SDB: 30% de agentes desnaturalizantes) y Solución de Densidad Alta (SDA: 55% de agentes desnaturalizantes). Las soluciones de partida empleadas para preparar estas soluciones de trabajo contenían 0% y 80% de agentes químicos desnaturalizantes, respectivamente. El equipo Gradient Delivery System® Modelo 475 (BioRad, EE.UU.) posibilitó la creación de un gradiente homogéneo.

La polimerización de los geles de acrilamida se catalizó mediante la adición a cada una de las soluciones de 0,7 µL/mL de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED; Sigma-Aldrich, EE.UU.) y 5 µL/mL de una solución al 10% (p/v) de persulfato amónico (APS; Panreac, España). La parte superior de los geles y los pocillos en los que se cargaron las muestras se prepararon con una solución de acrilamida carente de agentes desnaturalizantes. Esta solución se polimerizó con 0,5 µL/mL de TEMED y 3,8 µL/mL de APS. Una vez preparado el gel se mantuvo un mínimo de dos horas a temperatura ambiente hasta su completa polimerización.

La electroforesis se realizó en tampón TAE 0,5X utilizando el equipo de electroforesis vertical D-Code System (BioRad, EE.UU.), conectado a una fuente de alimentación C.E-865 (Consort NV, Bélgica). Antes de cargar las muestras, los geles ya polimerizados fueron sometidos durante 30 minutos a las condiciones electroforéticas determinadas para estos experimentos: 60°C y 200 V (Muyzer y col., 1993). Una vez efectuado este paso, se cargaron en el gel las muestras a analizar, que consistieron en 12 µL del producto amplificado con los cebadores 341F-GC/518R mezclados con 5 µL del tampón de carga de electroforesis (Tris-HCl 50, sacarosa 0,25 g/mL, azul de bromofenol 1 g/L, SDS 5 mg/mL). La electroforesis se llevó a cabo durante 3 horas y 30 minutos (modificado de Muyzer y col., 1993).

Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (10 µg/mL; Merck, Alemania) durante 5 minutos y posteriormente se lavaron en agua destilada durante 3 minutos. Los geles se observaron con un transiluminador EX26.MX (Vilber Lourmat, Francia) que emite luz UV a 312 nm de longitud de onda. Las imágenes de los geles se obtuvieron con una cámara digital Kodak Edas DC290 utilizando el programa Kodak 1D Image Analysis Software (Kodak, EE.UU.).

Los perfiles DGGE de las muestras naturales se compararon con los generados por las cepas aisladas de dichas muestras y se seleccionaron algunas para ser utilizadas como marcadores de migración en los análisis DGGE, lo que permitió la comparación de los resultados obtenidos en distintas electroforesis y la identificación aproximada de algunas bandas. Los perfiles DGGE de las muestras naturales también se compararon con los generados por los clones representativos de las unidades taxonómicas operacionales u OTUs (Operational Taxonomic Units) mayoritarias, con el fin de identificar con mayor precisión las principales comunidades bacterianas presentes.

2.3.5 CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS DE ADN Y ARN

Con el objetivo de identificar las principales comunidades microbianas de las muestras naturales, así como de los cultivos de enriquecimiento seleccionados, se construyeron genotecas a partir de los productos de PCR purificados de las regiones de estudio. Para la clonación y la transformación se utilizó el kit comercial TOPO-TA® Cloning Kit for sequencing (Invitrogen, EE.UU.) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. Este kit permite insertar los productos de PCR purificados en un vector de clonación, el plásmido pCR®4-TOPO® (Figura 2.3).

Dicho plásmido contiene dos genes que le confieren resistencia a ampicilina y kanamicina, además del gen letal de *Escherichia coli* ccdB, unido al extremo del carbono terminal del fragmento LacZα. Este sistema permite la selección directa de los recombinantes, ya que la ligación del producto de PCR purificado interrumpe la

expresión del *lacZ* α -*ccdB* (Bernard y Couturier, 1992; Bernard y col., 1994), de manera que únicamente es viable el crecimiento de los recombinantes que llevan el inserto al inocularlos en placas de Petri con un medio de cultivo selectivo.

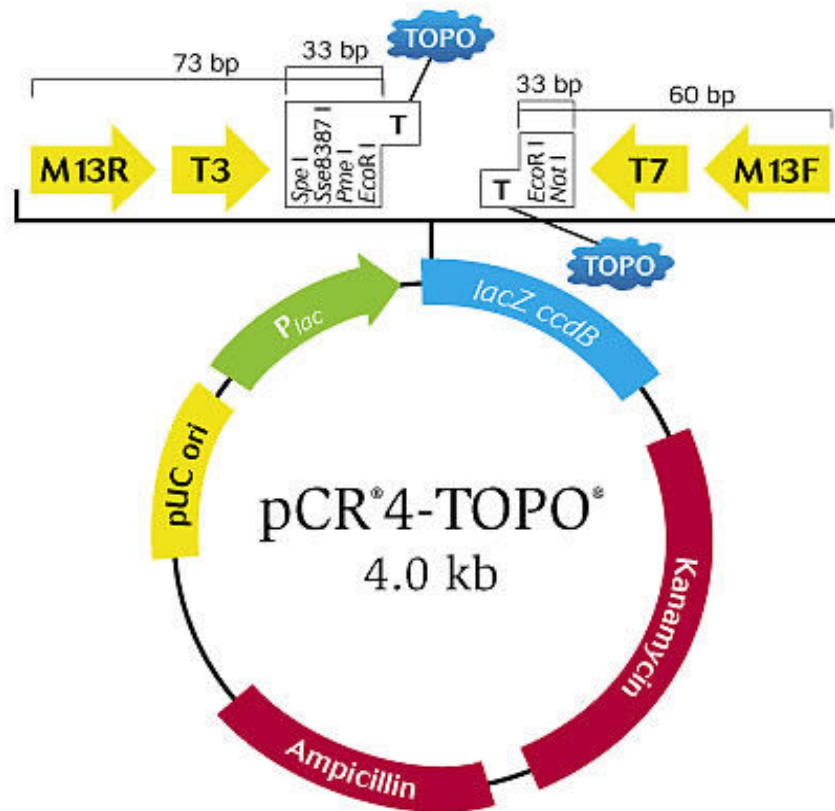


Figura 2.3 Esquema del plásmido pCR[®]4-TOPO[®].

Tras el paso de ligación del producto de PCR con el vector de clonación pCR[®]4-TOPO[®] con topoisomerasas, se llevó a cabo la transformación en células competentes de *Escherichia coli* One Shot Max Efficiency DH5 α -T1 competent cells (Invitrogen, EE.UU.).

Una vez llevada a cabo la transformación, las células se sembraron en placas Petri con medio de cultivo Luria Bertani (LB) (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, agar bacteriológico 20 g/L, pH 8) con ampicilina (100 mg/L) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al finalizar la incubación de las placas, se seleccionaron al azar aproximadamente 150 clones por muestra, siempre que fuera posible alcanzar ese número, escogiendo únicamente aquellas colonias bien diferenciadas del resto, y se transfirieron a placas de 96 pocillos que contenían medio líquido LB con ampicilina (100 mg/L), permaneciendo toda la noche en agitación a 250 rpm y a 37°C, en un incubador orbital Excella E24 (New Brunswick Scientific - Eppendorf, EE.UU.), con el objetivo de conseguir suficiente biomasa para los análisis. Al día siguiente, estos cultivos de clones se dividieron en dos alícuotas: a una de ellas se le adicionó glicerol al 80% y se conservó a -80°C, mientras que la otra fue sometida a

una PCR específica con el objetivo de comprobar si los clones poseían el inserto. Dicha PCR se llevó a cabo con la pareja de cebadores T7F (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') M13R (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') (Ausubel y col., 1992), específicos de la secuencia del vector, y unas condiciones de amplificación propias que consisten en un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, 35 ciclos que comprenden 15 segundos de desnaturalización a 95°C, 15 segundos de reasociación a 55°C y 30 segundos de elongación a 72°C, seguidos de un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 minutos. La composición de la mezcla de reacción fue idéntica a la utilizada con otros cebadores (apartado 2.2.3), empleando como ADN molde 1 µL de la suspensión en medio líquido de LB con ampicilina del clon a analizar.

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa como se ha descrito anteriormente en el apartado 2.2.3. Con este análisis se pudo confirmar si los clones poseían el plásmido y si éste en su interior presentaba el inserto del tamaño esperado.

2.3.6 ANÁLISIS DE SECUENCIAS: CLASIFICACIÓN EN OTUS E IDENTIFICACIÓN

Los clones que poseían inserto se enviaron a la empresa MacroGen Europe Sequencing Services (Países Bajos) donde se secuenciaron usando el cebador directo correspondiente al inserto estudiado: 616F, 27F, ITS1 y Arch109F. Las secuencias se editaron usando el software BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999). Para comprobar su calidad, se observaron sus cromatogramas y se corrigieron manualmente las posiciones indeterminadas por el secuenciador automático. Para cada una de las secuencias, se detectó la posición del inserto y se eliminaron las regiones correspondientes al vector de clonación. Las secuencias demasiado cortas o cuyo cromatograma mostraba baja calidad se eliminaron directamente de los análisis.

Se utilizó el programa Mothur (Schloss y col., 2009) para la detección de quimeras, estructuras constituidas por fragmentos de ADN que proceden de al menos dos microorganismos diferentes y que se generan durante la amplificación por PCR, siendo excluidas de los análisis todas aquellas detectadas como posibles quimeras. Este programa también se empleó para la construcción de las matrices de distancia de las secuencias y la asignación de las mismas a las Unidades Taxonómicas Operacionales u OTUs (Operational Taxonomic Units), para lo cual se utilizó como criterio de corte a nivel de especie una similitud de secuencia del 97%.

Además, se construyeron las respectivas curvas de rarefacción para cada una de las muestras analizadas, con el fin de estimar el grado de cobertura de los clones analizados con respecto a la diversidad esperable de la comunidad microbiana concreta total. Estas curvas se obtuvieron representando el número de clones procesados frente al número de OTUs que se generaron a nivel de especie (97% de similitud), género (95% similitud) y filo (80% similitud). Para cada OTU descrito se

seleccionó una secuencia como la representativa del grupo, denominada secuencia consenso.

Para determinar la identificación taxonómica de cada OTU, se analizó la similitud entre la secuencia del clon representativo y las existentes en la base de datos del GenBank, empleando el algoritmo BLASTn (Altschul y col., 1990) incluido en la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI, EE.UU.) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y en la base de datos EzTaxon (Chun y col., 2007; Kim y col., 2012). En la identificación de cada secuencia siempre se intentó concretar el máximo nivel taxonómico posible.

Las secuencias consenso de los OTUs de las genotecas correspondientes se depositaron en la base de datos nucleotídica GenBank. Para ello se utilizó la aplicación del European Nucleotide Archive (ENA) incluida en el European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI; <http://www.ebi.ac.uk/ena>). Los números de acceso de la base de datos GenBank asignados a las secuencias depositadas se correspondieron con HG008768-HG008780 y HG008829-HG008892.

2.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las relaciones filogenéticas establecidas entre las cepas seleccionadas de los depósitos negros de la Mina das Aveleiras (Braga, Portugal), relacionadas con la oxidación del manganeso, y las cepas de referencia de especies homólogas se estudiaron, en base al análisis de la región ARNr 16S. Estos análisis filogenéticos se realizaron utilizando las secuencias del gen 16S ARNr procedentes de los clones y las secuencias relacionadas (aquellas que tienen una cierta identidad con las secuencias de la muestra) obtenidas de las bases de datos del NCBI y Silva (Pruesse y col., 2007), empleándose en este último caso el servicio de alineamiento SINA (SILVA Incremental Aligner) v1.2.11 (Pruesse y col., 2012) implementado en la propia base de datos. Para la construcción de los árboles filogenéticos, las secuencias elegidas se alinearon usando la herramienta Muscle (Edgar, 2004) desarrollada por el European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI).

Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el algoritmo del vecino más próximo (Neighbour-Joining, NJ; Saitou y Nei, 1987) mediante el programa MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6.0; Tamura y col., 2013). Para estimar el peso relativo que tenían cada una de las ramas del árbol, se realizó un análisis aleatorio (test "bootstrap") con 1000 repeticiones.

2.5 ESTUDIOS MICROSCÓPICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE LOS ESPELEOTEMAS

2.5.1 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO (FESEM) Y ESPECTROSCOPIA DE ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X (EDS)

Estas técnicas se han utilizado para caracterizar la morfología y composición química de las muestras de espeleotemas, así como para detectar la presencia de microorganismos y extraer información sobre las interacciones microbio-mineral. Estos análisis se realizaron en el IST-UL, en colaboración con la Dra. Ana Zélia Miller.

Este microscopio crea imágenes ampliadas con mayores aumentos que la microscopía óptica mediante el uso de un haz de electrones de alta energía. La aplicación simultánea de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (SEM-EDS) permitió determinar la composición química de los depósitos minerales.

Las muestras se recubrieron mediante pulverización catódica (“sputtering”) con una capa fina de oro y paladio, y se observaron en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM, Field Emission Scanning Electron Microscopy) Jeol JSM-7001F (Jeol, Japón) en modo de electrones secundarios, y equipado con un detector de energía dispersiva de rayos X (Oxford Instruments Analytical, Reino Unido). La energía del haz de electrones utilizada fue de 15 kV y se tomaron imágenes a distintos aumentos.

Los microanálisis de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS), proporcionaron información cualitativa de la composición química de las muestras, representada con espectros e imágenes de distribución de los elementos químicos existentes en las mismas. Estos espectros se obtuvieron mediante el software INCA versión 7.0.

2.5.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión (conocido por sus siglas en inglés TEM) acoplado a un equipo de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) se aplicó con el objetivo de observar partículas minerales sobre las paredes celulares de los microorganismos presentes en los cultivos de enriquecimientos de las muestras de los depósitos negros de Oporto y de las Islas Canarias. Estos análisis se realizaron en el IST-UL, utilizando un microscopio H8100 (Hitachi, Japón) acoplado a un detector EDS modelo NoranSystem Six (ThermoNoran, EE.UU.).

Para estas observaciones, el material a analizar se colocó directamente en el interior de una rejilla de cobre, de diámetro aproximado de 2,5 mm, situada a su vez en un portamuestra unido a la platina.

2.5.3 ESPECTROSCOPÍA MICRO-RAMAN

Los depósitos negros del túnel de Paranhos se analizaron mediante espectroscopía Micro-Raman en la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nova de Lisboa (FCT-UNL) (Portugal) por la Dra. V.S.F. Muralha.

La espectroscopía Raman es capaz de aportar información sobre la composición química del material investigado. Algunas de las ventajas de esta técnica consisten en que no es destructiva ni invasiva, además de que no precisa preparación previa de las muestras y a cambio proporciona huellas químicas muy específicas.

Los espectros Raman se obtuvieron usando un espectrómetro LabRAM 300 (HORIBA Jobin Yvon, EE.UU.), equipado con un láser 17 mW He-Ne operando a 632,8 nm. El rayo láser fue concentrado sobre una lente de objetivo 50x (Olympus, Japón). La energía láser se filtró al 10% y 1% usando un filtro de densidad neutral para todos los análisis.

2.5.4 ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJOS CON TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier ("Fourier transform infrared spectroscopy", FTIR) es una técnica de espectroscopía molecular y un método de análisis químico, aplicable en prácticamente cualquier campo, pues ofrece análisis cualitativos y cuantitativos de una gran variedad de muestras orgánicas e inorgánicas (Griffiths y De Haseth, 2007).

Antes de comenzar con los análisis propiamente dichos, fue preciso eliminar las moléculas de agua de la muestra, secándola a 70°C durante 24 horas, y limpiar todo el material necesario con alcohol, ya que la técnica es muy sensible y tiende a dar resultados erróneos si alguna partícula no perteneciente a la muestra es introducida. A continuación, con la muestra seca se preparó una pastilla transparente, mezclando 1 mg de muestra y 100 mg de KBr aproximadamente, siendo triturados conjuntamente en un mortero de ágata no poroso. La mezcla triturada obtenida fue introducida en un molde de 13 mm de diámetro para la preparación de pastillas al vacío (Atlas™ Evacuable Pellet Dies, SPECAC, UK). Este molde fue introducido a su vez en una prensa hidráulica manual (SPECAC, UK) a la que se conectó una bomba de vacío (SCHOTT Ibérica, España) que eliminó el aire y la humedad durante el proceso de prensado. Se aplicaron 10 toneladas de presión sobre la muestra triturada para, finalmente, obtener una pastilla fina, compacta y transparente.

Los análisis de las pastillas de KBr obtenidas se realizaron en un espectrofotómetro FTIR-6300 (JASCO, Japón), asociado al programa informático Spectra Manager versión 2 (JASCO, Japón). Los parámetros empleados fueron un rango de medida de longitud de onda en la región de 400-4000 cm^{-1} y una resolución de 2

cm^{-1} en modo de transmitancia, con un detector termal estándar de tipo TGS (Tri-Glicerina-Sulfato) suministrado con el instrumento.

Se han analizado mediante FTIR muestras de birnesita sintetizada en el laboratorio, para obtener espectros de infrarrojos de óxidos de manganeso con los que poder comparar los espectros obtenidos de las muestras de los depósitos negros del túnel de Paranhos (Oporto, Portugal) en sus respectivos cultivos de enriquecimiento. La mayoría de los minerales de óxidos de Mn tienen muy baja cristalinidad, lo que dificulta su identificación mediante difracción de rayos X. La espectroscopía FTIR es una técnica que facilita su análisis, ya que es sensible tanto a materiales cristalinos como a materiales amorfos (Potter y Rossman, 1979).

2.6 OBTENCIÓN DE BIRNESITA SINTÉTICA

La producción de óxidos de Mn en el laboratorio es un paso importante para lograr comprender el mecanismo por el que se lleva a cabo la oxidación microbiana (Miller y col., 2013).

Con el objetivo de obtener birnesita con la que poder realizar comparaciones con las muestras de depósitos negros, especialmente para los estudios mediante SEM y FTIR, se procedió a realizar el protocolo de obtención de birnesita sintética descrito por Oaki e Imai (2007), con algunas modificaciones.

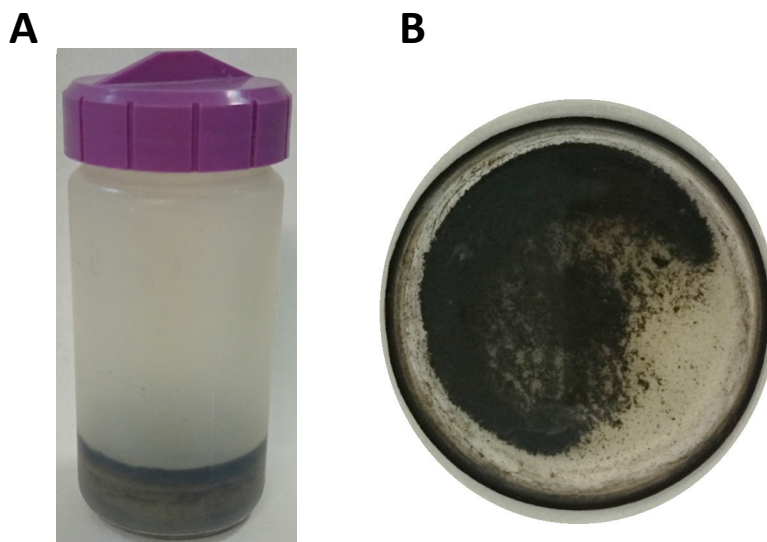


Figura 2.4 Obtención de birnesita sintética. A. Birnesita precipitada en las paredes del tubo de centrífuga. B. Birnesita precipitada en el fondo del tubo de centrífuga.

Se partió de 300 mL de una solución stock de EDTA dihidratado (20 mM), preparada con agua destilada a temperatura ambiente, en la que se disolvió MnCl_2 (20 mM). Para cada reacción de síntesis de birnesita, se tomaron 25 mL de la solución stock en un tubo de centrífuga de polipropileno de 50 mm de diámetro y 120 mm de alto. A continuación, sobre la solución stock se añadieron 25 mL de NaOH (200 mM)

mediante una pipeta Pasteur, gota a gota. En cuanto se produjo el contacto entre el NaOH y la solución stock, se obtuvo inmediatamente un líquido transparente amarillo que fue cambiando a marrón oscuro de aspecto turbio en unos 3 minutos. A los 30 minutos se pudieron observar precipitados en la base del tubo de centrífuga y a los 90 minutos el sobrenadante se volvió claro mientras un polvo pardusco precipitaba en el fondo del tubo lentamente. El tubo de centrífuga se selló con Parafilm M® (Bemis NA, EE.UU) y se dejó reposar a temperatura ambiente de 3 a 5 días. Pasado ese tiempo, toda la birnesita precipitó, tanto en las paredes (Figura 2.4 A) como en el fondo (Figura 2.4 B) del tubo de centrífuga. Finalmente, en algunos casos fue necesario centrifugar a 250 rpm durante 2 minutos para facilitar la separación del precipitado respecto al sobrenadante, mientras que en otros casos no fue preciso.

2.7 ESTUDIO DEL GEN *mofA*

El gen *mofA* codifica una enzima de tipo oxidasa multicobre (MCO), involucrada en la oxidación del manganeso en bacterias como *Leptothrix discophora* (Corstjens y col., 1997). Siguiendo los métodos propuestos por Siering y Ghiorse (1997) con algunas modificaciones, se realizaron diversas amplificaciones por PCR con cebadores específicos para averiguar si existía presencia del gen *mofA* en las muestras naturales de depósitos negros de Oporto y sus cultivos de enriquecimiento, así como en diversas cepas aisladas de dichas muestras y algunos clones. También se introdujo en este análisis la cepa *Leptothrix cholodnii* LMG 8142 como control positivo, debido a que es poseedora del gen (Siering y Ghiorse, 1997).

Para ello, se emplearon dos parejas de cebadores diferentes. La primera estuvo compuesta por cebadores no degenerados que amplificaban 700 pb del gen *mofA*: el cebador directo MAU (5'-GGC TTC ACC GAG TTC ACG CA-3') y el cebador reverso MAL (5'-CCA GCG GGG TGT CCA TCC AG-3') (Siering y Ghiorse, 1997). La segunda pareja consistió en los cebadores degenerados que amplifican unos 200 pb del gen *mofA* y que se sintetizaron con una cola en la posición 5' que contenía los sitios de restricción de las enzimas Sall (en el cebador directo) y EcoR1 (en el cebador reverso): MDF (5'-cgtcgacAGY GAY TCN TGG TT-3') y MDR (5'-agaattcNGG NGT RTC CAT CC-3') (Siering y Ghiorse, 1997). Debido a que los cebadores no degenerados no siempre aportan buenos resultados y no muestran la banda característica de 700 pb del gen *mofA*, fue preciso realizar una comprobación mediante los cebadores degenerados en una segunda PCR para realmente sacar conclusiones sobre la presencia del gen en las muestras.

La mezcla de reacción de estos cebadores es idéntica a la descrita en el apartado 2.2.3, únicamente reajustando las cantidades de cada reactivo a la mitad de volumen de reacción, 25 µL. El protocolo de amplificación por PCR para la amplificación con los cebadores no degenerados consistió en 4 minutos a 94°C, seguido de 31 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C y un minuto a 74°C, para

terminar una elongación final a 74°C durante 5 minutos. El protocolo de amplificación empleando los cebadores degenerados fue optimizado respecto al número de ciclos y temperaturas, empezando por 3 ciclos de 2 minutos a 94°C, 1 minuto a 40°C y un minuto a 74°C, para continuar con 31 ciclos de 2 minutos a 94°C, 1 minuto a 60°C y 74°C, finalizando con 5 minutos de elongación a 74°C.

En este estudio, se han probado ambas parejas de cebadores con todas las muestras de depósitos de ferromanganeso analizadas.

2.8 REACTIVO LEUCOBERBELIN BLUE-I

Un método utilizado por algunos autores para la detección de la oxidación biológica de manganeso y/o su reducción consiste en emplear un compuesto trifenilo sintetizado por Altmann (1972), sensible a compuestos con manganeso en estados desde el Mn(III) al Mn(VII), pero insensible al Mn(II) y otros metales en concentraciones traza. Este reactivo se presentó como adecuado para la detección y enumeración de microorganismos que son capaces de oxidar manganeso.

El reactivo se denomina Leucoberbelin blue-I (leucobase del compuesto N,N'-dimetilamino-p,p'-trifenilmetano-o'-ácido sulfónico) (LBB, Sigma-Aldrich, EE.UU.). Su síntesis y especificaciones fueron descritas por Altmann (1972). Es capaz de oxidarse en unos segundos en presencia de Mn(III)-Mn(VIII), mostrando un intenso color azul.

Para empezar, fue preciso preparar una solución stock concentrada (4 g/L) del reactivo Leucoberbelin blue-I, siguiendo las indicaciones aportadas por Krumbein y Altmann (1973), con algunas modificaciones: 100 mg de Leucoberbelin blue-I se diluyeron en 25 mL de agua destilada previamente acidificada a pH 3,5 mediante la adición de ácido fosfórico (85%). Con el objetivo de conservarla a largo plazo, se añadieron 0.3 ml de una solución concentrada de NH₄OH y se mantuvo a 4°C en condiciones de oscuridad. A continuación, se prepararon dos diluciones de trabajo en ácido acético (1 mM) a partir del stock: una dilución 1:25 (de 160 mg/L) y otra dilución 1:2,5 (de 1600 mg/L). Tanto el stock como las diluciones de trabajo se pusieron en contacto con los cultivos de enriquecimiento en relación 1:2 (alcanzando concentraciones finales de 2 g/L, 0,8 g/L y 0,08 g/L, respectivamente) y, en el caso de los cultivos en placa, se añadieron unas gotas de las diluciones sobre las colonias que presentaban precipitados, así como coloración negra o marrón.

El reactivo se mantuvo en contacto con la muestra en estudio durante unos 2-10 minutos, debido a que requería cierto tiempo para poder reaccionar con los óxidos de manganeso. Si la reacción fue positiva, se observó un cambio de color de azul claro a azul intenso.

Se llevaron a cabo experimentos con el reactivo Leucoberbelin blue-I y cultivos de enriquecimiento y placas sembradas con las muestras naturales de depósitos negros, en primer lugar con el objetivo de poner de manifiesto la presencia de óxidos de manganeso y, en segundo lugar, para disolverlos y someter posteriormente las muestras a extracción de ADN y DGGE, como una manera de facilitar la identificación de los microorganismos que dan lugar a los filamentos reticulados.

CAPÍTULO 3

MINA DE AGUA DE PARANHOS (OPORTO, PORTUGAL)

3.1 LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LA MINA DE AGUA DE PARANHOS

La ciudad de Oporto, localizada junto al Río Duero en el noroeste de Portugal, es una de las más antiguas de Europa. Su historia se remonta al siglo I a.C., cuando bajo la ocupación romana se convirtió en un destacable centro administrativo y comercial, designando a la región con el nombre de “Portus Cale” (Rebelo da Costa, 1788). En el siglo VI d.C. fue invadida por los suevos. Sin embargo, el dominio del pueblo germánico sobre la ciudad no duró mucho tiempo, debido a que los árabes la invadieron en el año 584 d.C. y lograron establecerse en ella. Fueron expulsados definitivamente en el año 868 d.C., hecho que está considerado como uno de los acontecimientos más importantes de la historia antigua de la ciudad (de Oliveira Marques, 1972). Desde entonces, Oporto se convirtió en el centro del movimiento de la Reconquista Cristiana en la Península Ibérica y, a partir del siglo XII, se fue transformando en una importante urbe, desarrollada a lo largo de los acantilados graníticos del Río Duero. Debido al enorme patrimonio arquitectónico e histórico que alberga la ciudad, su Centro Histórico consiguió el reconocimiento como Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO en 1996 (Afonso y col., 2007a).

Antiguamente, el suministro de agua a la ciudad de Oporto se realizaba mediante fuentes públicas alimentadas por manantiales. A lo largo de los siglos se excavaron diversas galerías subterráneas, o minas de agua, para captar el agua de estos manantiales. El túnel de Paranhos (también conocido como “Arca d’Água” o “Arca das Três Fontes”) era una de las principales galerías. Su construcción se llevó a cabo en el siglo XVI y se trataba de una de las mayores minas de agua excavadas en la roca granítica sobre la que se encontraba edificada la ciudad de Oporto. Durante siglos constituyó uno de los principales medios para facilitar la captación, el transporte, drenaje y abastecimiento de agua subterránea para la población de la ciudad (Amorim y Pinto, 2001; Afonso, 2003), hasta que esta infraestructura fue perdiendo importancia a finales del siglo XIX, a medida que se fueron implantando los sistemas de tuberías actuales. El túnel tiene 3.289 Km de longitud, dividido en tres secciones, cada una con tres puertas de entrada a su vez. El diámetro interno de la galería es de aproximadamente 2,20 m, con una profundidad máxima de 21 m respecto al nivel del suelo y más de 38 pozos verticales (Chaminé y col., 2010).

Por todos estos motivos, es considerado un elemento importante en el Patrimonio Cultural Subterráneo de Oporto, con un uso potencial para el geoturismo subterráneo, aunque antes es preciso establecer condiciones adecuadas de seguridad para los futuros visitantes (Fernandez-Cortes y col., 2014).

Hoy en día, debido a la disminución de la calidad del agua subterránea y al deterioro y abandono del túnel granítico, el agua que por él circula no se utiliza para el consumo humano, aunque algunos estudios hidrogeológicos han sugerido que sigue siendo apropiada para el riego (Afonso y col., 2007a).

A lo largo del curso del túnel de Paranhos, existen numerosas fuentes contaminantes de carácter antrópico y actividades urbanas superficiales como garajes, gasolineras, saneamiento in situ y red de alcantarillado, que provocan que este ambiente subterráneo presente una alta vulnerabilidad a la contaminación (Afonso y col., 2007b, 2010a) (Figura 3.1). Afonso y col. (2010b), demostraron previamente que el agua subterránea poseía una composición enriquecida en nitratos y sulfatos, probablemente resultante de la intensa urbanización, filtraciones de los sistemas de alcantarillado y algunas prácticas agrícolas.



Figura 3.1 Área urbana de Oporto con el recorrido del túnel de Paranhos e indicación del punto de muestreo (flecha verde), así como de las fuentes de contaminación potenciales: 1: Garaje. 2: Gasolinera. 3: Gasolinera combinada con garaje.

Este túnel subterráneo en granito con alto valor patrimonial otorga un hábitat favorable para una amplia variedad de microorganismos, los cuales pueden participar en la formación de minerales secundarios y la disolución de los componentes de la roca. Las condiciones ambientales del túnel de Paranhos, junto a la ausencia de luz y los más de cuatro siglos de existencia, garantizan la estabilidad de las formaciones minerales que allí se encuentran.

En esta mina de agua son especialmente abundantes los depósitos de ferromanganeso, que se pueden hallar recubriendo las paredes de granito de la misma. Por ello, también se encuentran ampliamente extendidos los procesos de biomineralización relacionados con dichos compuestos (Miller y col., 2012b).

Generalmente, las superficies de granito presentan depósitos negros expuestos a la filtración de agua, y cuyo espesor varía desde menos de 1 mm a aproximadamente 1 cm.

3.2 LOCALIZACIÓN Y RECOGIDA DE MUESTRAS

Para realizar el estudio de los tipos de espeleotemas de la mina de agua de Paranhos (Figura 3.2 A) se llevó a cabo una exhaustiva campaña de muestreo repartida a lo largo de varios años. El área de muestreo estaba localizada a 100 m respecto a una de las entradas secundarias del túnel, a unos 3 m de profundidad bajo el nivel del suelo (Figura 3.1).

En junio de 2009, julio de 2010 y marzo de 2011 se tomaron muestras de depósitos negros de ferromanganeso, desarrollados sobre las paredes del túnel, que se encontraban asociados a infiltraciones de agua subterránea, los cuales ya fueron observados y caracterizados (Miller y col., 2012a, 2012b). En febrero de 2012 y marzo de 2013, se comprobó que los depósitos negros cubrían una extensión de aproximadamente 3 m y se tomaron nuevas muestras de dichos depósitos, denominadas 0212T2A y 0313T2A, respectivamente (Figura 3.2 B).

Por otra parte, en julio de 2010 también se recogieron depósitos blancos de carbonato de calcio (moonmilk), que se encontraban recubriendo las paredes y el techo de Paranhos (Figura 3.2 C), hecho importante puesto que, hasta ahora, nunca se había documentado la presencia de esta clase de espeleotema en un ambiente subterráneo excavado en granito. Esta muestra de moonmilk fue denominada 0710T2-6F.

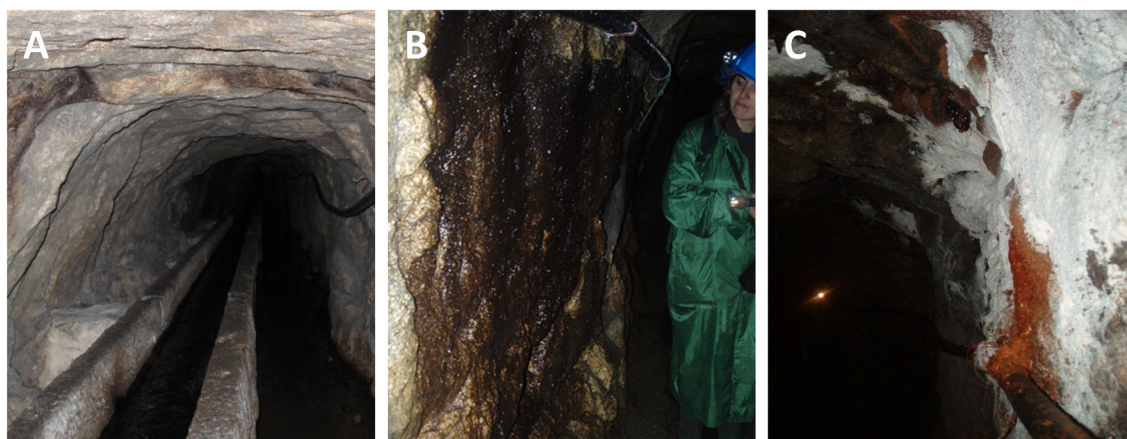


Figura 3.2 A. Sección del túnel de Paranhos, en la que se observa la acequia que conduce el agua drenada. B. Depósitos negros recubriendo las paredes de la mina. C. Depósitos de carbonato de calcio (moonmilk) en las paredes y el techo de la mina.

En todos los casos, las muestras poseían aspecto blando y eran fácilmente extraíbles de la pared. Fueron tomadas de forma que proporcionaran material suficiente y representativo de los depósitos presentes en la mina, raspándolas de la

superficie de granito con instrumental estéril, siendo sucesivamente depositadas en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, también estériles. Inmediatamente fueron transportadas al laboratorio para proceder a los análisis.

Las muestras recogidas en este túnel se analizaron mediante técnicas moleculares, con la construcción de genotecas, y técnicas microscópicas y espectroscópicas, para detectar la presencia de microorganismos y extraer información sobre las interacciones microbio-mineral.

Además, las muestras de depósitos negros de ferromanganeso se inocularon en medios sólidos y líquidos apropiados y se cultivaron en el laboratorio, con objeto de aislar bacterias implicadas en los procesos de oxidación de estos depósitos en la mina de agua objeto de estudio y obtener una mayor comprensión de los mismos. Para estas muestras también se realizó un análisis comparativo mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE).

Por otra parte, se llevaron a cabo otras técnicas complementarias, entre las que se encuentran la obtención de birnesita sintética, el estudio del gen *mofA* y la aplicación del compuesto Leucoberbelin blue-I.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 MUESTRAS DE DEPÓSITOS NEGROS 0212T2A y 0313T2A

➤ Bacterias cultivadas

De las muestras 0212T2A y 0313T2A de Oporto se aislaron un total de 111 cepas bacterianas, agrupadas en 33 especies diferentes. La Tabla 3.1 recoge las identificaciones de los aislamientos, mostrándose las especies filogenéticamente más próximas disponibles en la base de datos Ez-Taxon. Es preciso mencionar que los aislamientos obtenidos de la muestra recogida en 2012 fueron muy similares a las bacterias aisladas de la muestra de 2013, motivo por el que las secuencias del gen del ARNr 16S de los aislados se trataron conjuntamente (Tabla 3.1).

La distribución de las afiliaciones filogenéticas de las cepas bacterianas aisladas de las muestras de depósitos negros se recoge en la Figura 3.3. El 80% del total de las bacterias aisladas correspondieron a Gammaproteobacteria y Firmicutes, siendo la clase Gammaproteobacteria la más representada con el 43% del total. El filo Actinobacteria representó el 13% y la clase Alphaproteobacteria fue la menos representada con únicamente un 7%. Prácticamente la totalidad de las bacterias aisladas estuvieron afiliadas a los géneros *Bacillus* (29,7%), *Arthrobacter* (9%), *Pseudomonas* (36%), y *Ensifer* (7,2%), pertenecientes a los filos Firmicutes, Actinobacteria y las clases Gammaproteobacteria y Alphaproteobacteria, respectivamente (Tabla 3.1). Además, se aislaron especies de los géneros

Paenibacillus, *Brevibacterium*, *Azotobacter*, *Streptomyces* y *Micromonospora*, pero en menores proporciones dentro sus respectivos filos y clases. *Paenibacillus* y *Brevibacterium* representaron un 6,3% y 1% del total respectivamente, pertenecientes al filo Firmicutes, *Azotobacter* un 7,2% del total, dentro de Gammaproteobacteria, y *Streptomyces* y *Micromonospora*, afiliados a Actinobacteria, únicamente un 3,6 % del total.

Respecto a su procedencia, la mayor parte de las cepas bacterianas más cercanas taxonómicamente a las aisladas de los depósitos negros del túnel de Paranhos, procedían de distintas clases de suelos y sedimentos (alrededor del 55% de los aislamientos) y lodo activado (12,6%). Concretamente en la clase Gammaproteobacteria, las más cercanas taxonómicamente, se aislaron en su mayoría de suelos tratados con herbicida (un 42,5% de ellas), debido a la alta representación de la cepa *Pseudomonas linyingensis* dentro de esta clase (Tabla 3.1).

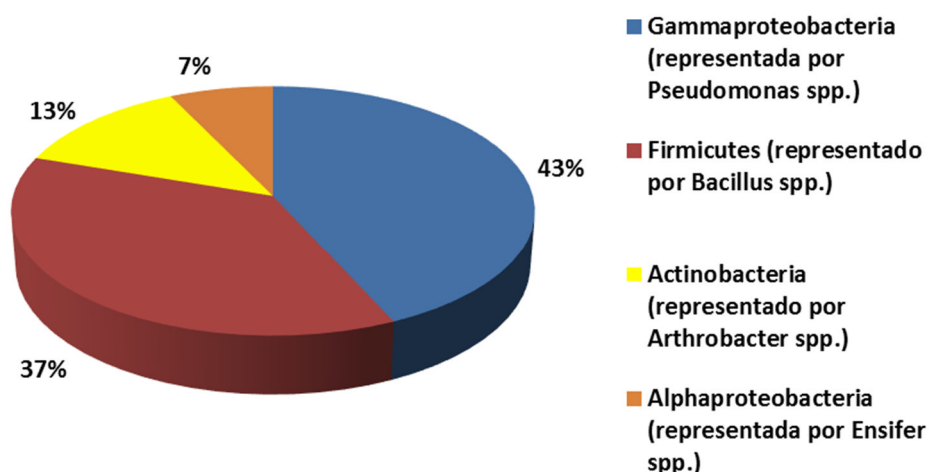


Figura 3.3 Afiliaciones filogenéticas de las cepas bacterianas aisladas de las muestras de depósitos negros recogidas en Oporto en 2012 (0212T2A) y 2013 (0313T2A).

Tabla 3.1 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas aisladas de las muestras 0212T2A y 0313T2A.

Cepa	Nº aislados*	Identificación molecular Ez Taxon (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)
Gammaproteobacteria				
0212T2A – LX34	12	<i>Pseudomonas linyingensis</i> LYBRD3-7 (HM246142)	Suelo tratado con herbicida	97
0212T2A – SLY13	8	<i>Pseudomonas resinovorans</i> LMG 2274 (Z76668)	Lodo activado	97
0212T2A – SLY55	5	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> NCIMB 1949 (X99540)	Sangre de pez moribundo	97
0212T2A – M7-3	4	<i>Pseudomonas linyingensis</i> LYBRD3-7 (HM246142)	Suelo tratado con herbicida	97
0212T2A – LX16	4	<i>Azotobacter beijerinckii</i> ATCC 19360 (AJ308319)	Lodo activado	97
0212T2A – LX15	3	<i>Azotobacter chroococcum</i> IAM 12666 (AB175653)	Suelo	97
0212T2A – SLY24.2	3	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> LMG 1224 (Z76653)	Suelo y agua	97
0313T2A – M7-5	2	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> NCIMB 1949 (X99540)	Sangre de pez moribundo	97
0212T2A – SLY7	2	<i>Pseudomonas resinovorans</i> LMG 2274 (Z76668)	Lodo activado	96
0212T2A – M7-1	1	<i>Pseudomonas linyingensis</i> LYBRD3-7 (HM246142)	Suelo tratado con herbicida	100
0212T2A – M7-1'	1	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> LMG 1224 (Z76653)	Suelo y agua	97
0212T2A – LX31	1	<i>Azotobacter chroococcum</i> IAM 12666 (AB175653)	Suelo	96
0212T2A – SLY41	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM 5962 (Z76651)	No especificada	97
0212T2A – SED5	1	<i>Pseudomonas umsongensis</i> Ps 3-10 (AF468450)	Suelos agrícolas coreanos	100
Firmicutes				
0212T2A – M3-2	6	<i>Paenibacillus castaneae</i> Ch-32 (EU099594)	Filosfera	97
0212T2A – ROUF4	4	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 (ACNF01000156)	Tejido animal	99
0212T2A – M3-5	3	<i>Bacillus acidicer</i> CBD 119 (DQ374637)	Espécimen forense con anthrax	99
0212T2A – M3-11	3	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 (AB363738)	Suelo árido cálido	100
0212T2A – M3-1	2	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (AE016877)	No especificada	100
0212T2A – M3-9	2	<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048 (ACMU01000002)	Suelo	99
0212T2A – M1-7	2	<i>Bacillus oceanisediminis</i> H2 (GQ292772)	Muestra de sedimento	99
0212T2A – M3-14	2	<i>Bacillus vietnamensis</i> 15-1 (AB099708)	Salsa de pescado vietnamita	99
0212T2A – M3-6	2	<i>Bacillus idriensis</i> SMC 4352-2 (AY904033)	Paciente con sepsis neonatal	99
0212T2A – LX6	2	<i>Bacillus vietnamensis</i> 15-1 (AB099708)	Salsa de pescado vietnamita	99
0313T2A – Ay1	2	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578 (AB190217)	Suelo	98
0313T2A – ROUF12	2	<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048 (ACMU01000002)	Suelo	99
0212T2A – M1-1	1	<i>Bacillus halmapalus</i> DSM 8723 (X76447)	Suelo	99

0212T2A – M2-2	1	<i>Bacillus oceanisediminis</i> H2 (GQ292772)	Muestra de sedimento	97
0212T2A – SLY38	1	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792 (ACNF01000156)	Tejido animal	97
0212T2A – M2-5	1	<i>Bacillus halosaccharovorans</i> E33 (HQ433447)	Lago hipersalino	92
0212T2A – M3-12	1	<i>Paenibacillus terrigena</i> A35 (AB248087)	Suelo	98
0212T2A – M6B5.2	1	<i>Bacillus horikoshii</i> DSM 8719 (X76443)	Suelo	99
0212T2A – ROUF5	1	<i>Bacillus aryabhattai</i> B8W22 (EF114313)	Criovial	100
0313T2A – Ay2	1	<i>Bacillus luciferensis</i> LMG 18422 (AJ419629)	Suelo de una fumarola activa	97
0212T2A – M3-3	1	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> DSM 8801 (AM747813)	Suelo	99
Actinobacteria				
0212T2A – M3-7	3	<i>Arthrobacter globiformis</i> NBRC12137 (BAEG01000072)	Suelo	100
0212T2A – LX19	3	<i>Arthrobacter methylophilus</i> TGA (AF235090)	Suelo	98
0313T2A – M7-8	2	<i>Streptomyces spororaveus</i> LMG 20313 (AJ781370)	No especificada	100
0212T2A – SLY22	2	<i>Arthrobacter ramosus</i> CCM 1646 (AM039435)	Suelo forestal	99
0212T2A – SLY37	1	<i>Arthrobacter pascens</i> DSM 20545 (X80740)	Suelo de un campo	99
0212T2A – SLY29	1	<i>Streptomyces spororaveus</i> LMG 20313 (AJ781370)	No especificada	99
0212T2A – M4-24	1	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029 (CP002162)	Suelo	100
0212T2A – SED1	1	<i>Arthrobacter methylophilus</i> TGA (AF235090)	Suelo	98
Alphaproteobacteria				
0212T2A – SED2	6	<i>Ensifer adhaerens</i> LMG 20216 (AM181733)	Suelo	99
0313T2A – ROUF4	1	<i>Ensifer adhaerens</i> LMG 20216 (AM181733)	Suelo	99
0313T2A – BNF3	1	<i>Ensifer mexicanus</i> ITTG R7(DQ411930)	<i>Acacia angustissima</i>	97

* Aislamientos que comparten una similitud $\geq 99\%$.

➤ Cultivos de enriquecimiento

Los cultivos de enriquecimiento de las muestras de depósitos negros 0212T2A y 0313T2A en medios líquidos selectivos mostraron crecimiento visible tras un periodo de incubación que osciló entre uno y dos meses. En el caso de los medios de cultivo ricos en componentes de manganeso y hierro, como el M7, Rouf modificado y PC, el crecimiento estuvo siempre asociado con precipitados de color negro o marrón oscuro.

El medio Rouf modificado es el que mejor resultado dio, ya que fue el primero en presentar crecimiento así como gran cantidad de precipitados oscuros. Concretamente, los frascos de vidrio Pyrex con este medio y portaobjetos de vidrio en su interior, sufrieron un cambio de color de marrón claro (Figura 3.4 A) a negro muy intenso (Figura 3.4 B) al cabo de un mes tras ser sembrados con las muestras naturales. Dicho color lo iban perdiendo paulatinamente una vez el frasco se abría para extraer precipitados del cultivo (Figura 3.4 C), hasta volver de nuevo al color marrón inicial (Figura 3.4 A). Si el frasco no se abría en ningún momento, podía permanecer con el color negro de forma indefinida. Es preciso señalar que si el mismo medio se sembraba en matraz sin cierre hermético o sin portaobjetos no sufría ningún cambio de color.

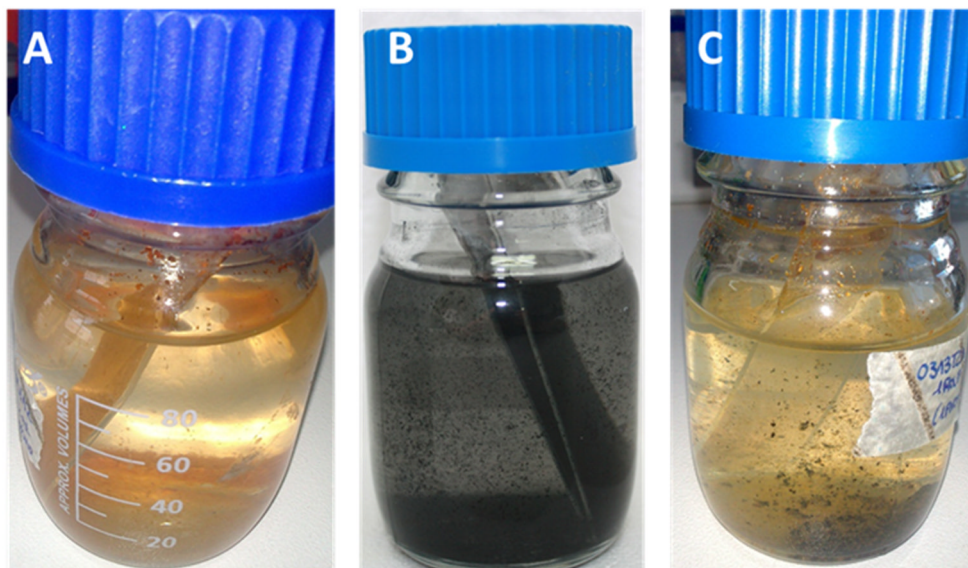


Figura 3.4 Progresión en el cambio de color de un frasco con medio Rouf modificado y portaobjetos en su interior, sembrado con una muestra de depósitos negros de Oporto. A. Color marrón inicial. B. Color negro obtenido manteniendo el frasco cerrado durante un tiempo variable. C. Reversión paulatina al color marrón inicial tras la apertura del frasco.

También cabe resaltar que los cultivos de enriquecimiento sembrados con la bacteria de la colección belga *Leptothrix cholodnii* LMG 8142 no presentaron

ningún cambio de color, permaneciendo siempre de color marrón (Figura 3.5 A). Los cultivos en placa sí mostraron colonias con color marrón característico (Figura 3.5 B).

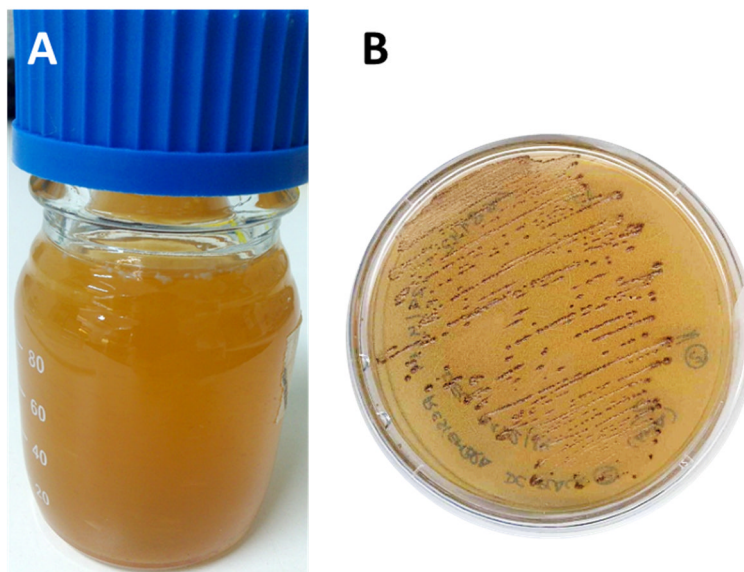


Figura 3.5 Cultivos de *Leptothrix cholodnii* LMG 8142. A. Cepa sembrada en medio Rouf modificado líquido. B. Cepa sembrada en medio Rouf modificado sólido.

El medio de cultivo de enriquecimiento Rouf modificado sembrado con las muestras 0212T2A y 0313T2A en frascos Pyrex y portaobjetos fue sometido a distintos análisis posteriores, con el objetivo de identificar los microorganismos implicados en la teórica oxidación del manganeso presente en el medio de cultivo.

En base a las observaciones iniciales sobre el cambio de color en el medio de cultivo Rouf modificado, se sembró otro frasco de manera análoga sobre el que se realizaron medidas de pH semanales, desde el momento inicial de la siembra, para saber si podía tener alguna influencia para la obtención de los precipitados oscuros. Las fluctuaciones observadas en el pH fueron leves, pero resaltables.

Los resultados de las variaciones en el pH se han recogido de forma esquemática en la Figura 3.6. Inicialmente, el pH del medio Rouf modificado sin sembrar se encontraba en la neutralidad y presentaba un color marrón característico. Al cabo de 15 días, el pH se acidificó ligeramente y mostró un cambio a color negro. A los dos meses, el pH se mantenía estable, sin una modificación apreciable, pero sí se comenzó a observar un cambio de color de negro a marrón, revirtiendo poco a poco a causa de haber abierto el bote para tomar las medidas de pH, por lo que perdió el hermetismo. A los dos meses y medio, el pH empezó a subir, conservando el medio el mismo color aún. Finalmente, al cabo de tres meses, el medio ya mostró totalmente el color marrón inicial de antes de la siembra y llegó a alcanzar un pH más básico, cercano a 8 (Figura 3.6).

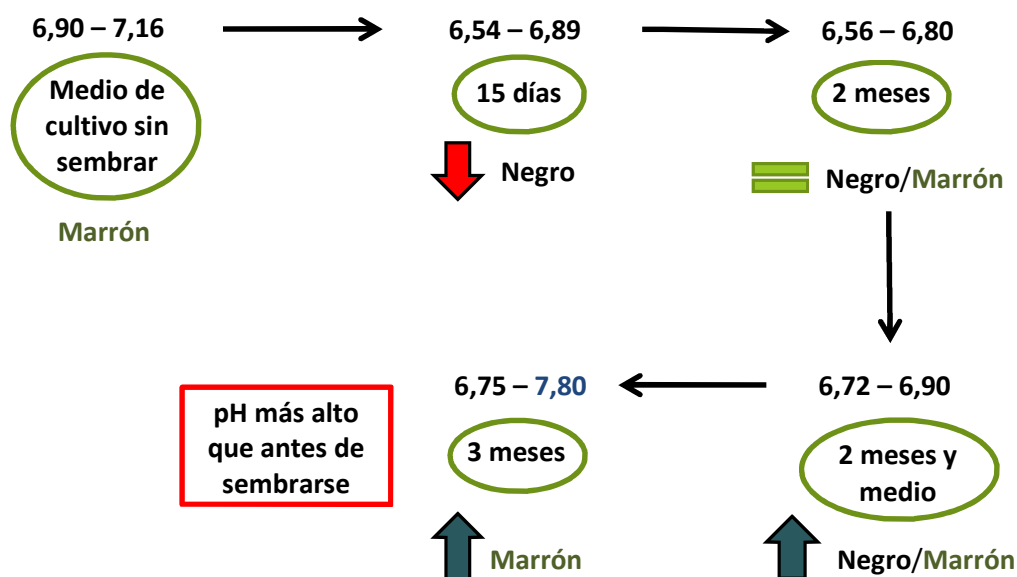


Figura 3.6 Variaciones en el pH recogidas a lo largo de 3 meses en el bote Pyrex con cultivo de enriquecimiento Rouf modificado sembrado con la muestra 0212T2A.

En cuanto a las medidas del potencial redox, se compararon los valores de un cultivo de enriquecimiento negro y otro marrón en medio Rouf modificado sembrado con cada una de las muestras de depósitos negros de Oporto, obteniéndose los valores que se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Medidas del potencial redox en los cultivos de enriquecimiento de las muestras de depósitos negros de Oporto.

Muestra	Color	Temperatura	pH	Potencial redox
0212T2A	Marrón	24°C	7,36	0,23 V
0212T2A	Negro	24°C	7,38	0,15 V
0313T2A	Marrón	24°C	7,03	0,12 V
0313T2A	Negro	25°C	6,99	0,05 V

En ambas muestras, el potencial redox es menor cuando el cultivo presenta color negro. El pH ronda la neutralidad en todas las muestras, al haberse abierto el frasco con el medio de cultivo y estar en fase de pérdida de hermetismo y transformación del color.

Por otra parte, se llevaron a cabo aislamientos en placas con medio Rouf modificado, con el objetivo de comprobar si era posible aislar alguna bacteria diferente respecto a los aislamientos de las muestras naturales que sólo hubiera podido desarrollarse en medio líquido. Del cultivo de enriquecimiento de la muestra 0212T2A se consiguieron obtener 9 aislamientos, todos ellos correspondientes a la misma cepa, cuyo resultado difiere según la base de datos consultada: *Pseudomonas putida* LT4

(JF703662, 99% de similitud) en NCBI y *Pseudomonas umsongensis* Ps3-10 (AF468450, 99% de similitud) en Ez Taxon.

Para la construcción de genotecas de los cultivos de enriquecimiento en medio Rouf modificado de las muestras 0212T2A y 0313T2A, se seleccionó el ADN total y el ARN obtenido mediante el método descrito Griffiths y col. (2000) (apartado 2.3.1), reservando el ADN obtenido por los otros métodos para los estudios comparativos mediante DGGE y el estudio del gen *mofA*. Se obtuvieron un total de 239 secuencias libres de quimeras de las muestras con las que se construyeron genotecas independientes de ADN y ARN, con el fin de detectar las bacterias totales y las metabólicamente activas presentes en las muestras objeto de estudio.

La distribución de los diferentes filos en las muestras se presenta en la Figura 3.7. En el caso de los cultivos de enriquecimiento negros, la clase Gammaproteobacteria fue mayoritaria en la muestra 0212T2A (representando el 94% de las secuencias de ADN y el 96% de las de ARN) (Figura 3.7 A y B), mientras que en la muestra 0313T2A correspondió a Betaproteobacteria (74% de las secuencias de ADN y 50% de las de ARN) (Figura 3.7 C y D).

Del ADN total extraído del cultivo de enriquecimiento negro de la muestra 0212T2A, se obtuvieron 53 secuencias de clones (Tabla 3.3). Casi el 100% de los clones se afiliaron a la clase Gammaproteobacteria, representada por *Pseudomonas putida*/*Pseudomonas umsongensis*. Únicamente el 6% de los clones se afilió a Firmicutes (4%) y Betaproteobacteria (2%), representados por *Desulfosporosinus meridei* y *Stenotrophomonas maltophilia*/*Cupriavidus necator*, respectivamente (Figura 3.7 A, Tabla 3.3).

Por otra parte, se obtuvieron 49 secuencias de bacterias metabólicamente activas de este mismo cultivo de enriquecimiento (Tabla 3.4). Las afiliaciones filogenéticas de las bacterias activas fueron bastante similares a las que se obtuvieron del ADN total, con porcentajes muy parecidos, a excepción de que la clase Betaproteobacteria estuvo representada por *Ralstonia eutropha*/*Cupriavidus necator* y el filo Firmicutes por *Clostridium* sp. (Figura 3.7 B, Tabla 3.4).

Por el contrario, las 47 secuencias del ADN total obtenidas de los cultivos de enriquecimiento negro de la muestra 0313T2A (Figura 3.7 C, Tabla 3.5), se afiliaron principalmente a Betaproteobacteria (74%), representada por *Noviherbaspirillum* spp., seguida de Firmicutes (15%), Gammaproteobacteria (9%) y Nitrospirae (2%). Dentro del filo Firmicutes, pudieron detectarse *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. y *Paenibacillus terrigena*. En cuanto a Gammaproteobacteria, se encontraron bacterias afiliadas a *Acinetobacter tjernbergiae* y una única cepa a la especie *Pseudomonas jessenii*. Además, Nitrospirae contó con la especie *Nitrospira*

calida como único componente, con bajo porcentaje de similitud respecto a su identificación más cercana (Tabla 3.5).

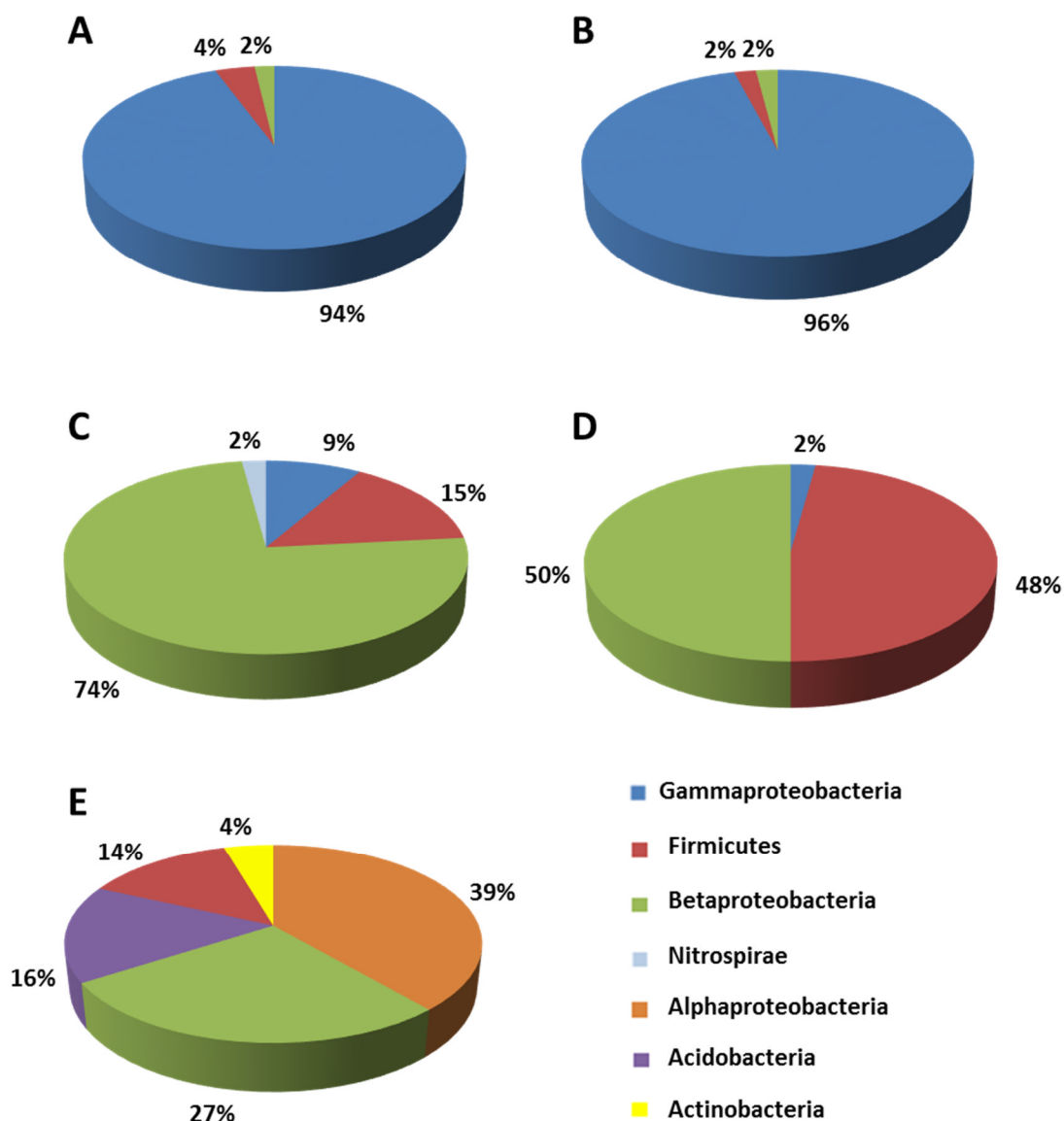


Figura 3.7 Distribución de filos en las muestras de cultivo de enriquecimiento en medio Rouf modificado de los depósitos negros de Oporto. A. Genoteca de ADN de cultivo negro de 0212T2A. B. Genoteca de ARN de cultivo negro de 0212T2A. C. Genoteca de ADN de cultivo negro de 0313T2A. D. Genoteca de ARN de cultivo negro de 0313T2A. E. Genoteca de ADN de cultivo marrón de 0313T2A.

En comparación con las bacterias metabólicamente activas del cultivo de enriquecimiento negro de la muestra 0313T2A (Figura 3.7 D, Tabla 3.6), la proporción de Firmicutes se vio incrementada respecto a Betaproteobacteria, alcanzando la cifra de casi el 50% de los clones. Betaproteobacteria (50%), estuvo representada por *Noviherbaspirillum* spp., así como por una especie atribuible al género *Janthinobacterium*. La clase Gammaproteobacteria (2%) estuvo representada

únicamente por una secuencia con una similitud baja (92%) respecto a su identificación más cercana (*Pseudomonas brassicacearum*). En el caso de las bacterias metabólicamente activas, no apareció ningún representante del filo Nitrospirae, al contrario que en los datos de las bacterias totales.

También se analizaron las bacterias totales de un cultivo de enriquecimiento en medio Rouf modificado de color marrón de la muestra 0313T2A, con el objetivo de comprobar si las comunidades bacterianas se veían modificadas debido al cambio de color del medio. Se analizaron 44 secuencias, distribuidas en una mayor variedad de filos que los datos obtenidos del cultivo análogo de color negro (Figura 3.7 E, Tabla 3.7). El filo Proteobacteria fue predominante con un 66%, perteneciente a Alphaproteobacteria (39%) y Betaproteobacteria (27%). Además, también estuvieron representados los filos Acidobacteria (16%), Firmicutes (14%) y Actinobacteria (4%). El género representativo de la clase Alphaproteobacteria fue *Ensifer*, predominando la especie *Ensifer medicae*. Con menor abundancia dentro de esta clase, se detectó la especie *Aminobacter anthyllidis*. Respecto a la clase Betaproteobacteria, la especie representante fue *Cupriavidus necator*, abarcando el 83% de todas las secuencias afiliadas dentro de esta clase. También se detectaron los géneros *Azoarcus* y *Herbaspirillum*. El filo Acidobacteria estuvo representado en su totalidad por 7 secuencias con porcentajes de similitud del 92-94% con la especie *Aridibacter famidurans*, lo que sugiere que podría tratarse incluso de otro género. Los filos minoritarios de Firmicutes (14%) y Actinobacteria (4%) estuvieron representados por *Bacillus mycoides* y *Pelosinus fermentans*, en el caso de Firmicutes, y por *Arthrobacter oryzae*, en el caso de Actinobacteria (Tabla 3.7).

Por otra parte, las secuencias obtenidas de las muestras de los cultivos de enriquecimiento y sus identificaciones se analizaron según su procedencia atendiendo a los datos del NCBI (Tablas 3.3 – 3.7). El 53% del total correspondió a bacterias procedentes de suelos contaminados, un 7,6% a bacterias de aguas residuales y estiércol, un 5,9% a bacterias del suelo de una mina de uranio y un 2,5% a bacterias de zonas industriales. El 31% restante englobó a bacterias procedentes de otro tipo de suelos, plantas, sedimentos y diversos ambientes naturales.

La mayoría de las bacterias de ambientes contaminantes se obtuvieron en los cultivos de enriquecimiento de color negro de las muestras 0212T2A y 0313T2A, especialmente en el de la muestra 0212T2A, debido a la presencia de la especie *Pseudomonas putida* procedente de suelo contaminado con metales, tanto para las bacterias totales como para las metabólicamente activas.

Los suelos contaminados de los que procedían las bacterias del cultivo de enriquecimiento negro de la muestra 0313T2A, poseían contaminantes de diferentes tipos, como hidrocarburos, pesticidas y tricloroetileno.

Por último, en el cultivo de enriquecimiento marrón de la muestra 0313T2A, la mayor parte de las bacterias procedentes de ambientes contaminados se afilió a la clase Betaproteobacteria, englobando a *Cupriavidus* sp., *Azoarcus* sp. y *Herbaspirillum* sp. La procedencia de *Cupriavidus* sp. se localizó en ambientes contaminados, aguas residuales, sedimentos y suelos contaminados con cadmio e incluso un cultivo de enriquecimiento con lodo de aguas residuales. *Azoarcus* sp. provino también de un ambiente contaminado y la única secuencia correspondiente a *Herbaspirillum* sp. de un suelo contaminado con hidrocarburos. Dentro del filo Firmicutes, se detectó una bacteria no cultivada procedente de un sedimento contaminado con uranio y *Pelosinus* sp. procedente de un acuífero contaminado.

Tabla 3.3 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias totales obtenidas del cultivo de enriquecimiento de color negro en medio Rouf modificado de la muestra 0212T2A (53 secuencias, 18 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Gammaproteobacteria						
12DNK88	35	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	100	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	100
12DNK13	2	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	97	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	97
12DNK1	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	97	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	100
12DNK82	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF825523)	Zona industrial	99	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (FJ168539)	97
12DNK28	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	97	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	98
12DNK124.2	1	<i>Pseudomonas migulae</i> (EU111725)	Suelo de rizosfera	92	<i>Pseudomonas migulae</i> (AF074383)	92
12DNK124	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF825523)	Zona industrial	98	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	97
12DNK123	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	97	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	97
12DNK112	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF825523)	Zona industrial	98	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	98
12DNK93	1	<i>Pseudomonas migulae</i> (EU111725)	Suelo de rizosfera	99	<i>Pseudomonas migulae</i> (AF074383)	100
12DNK91	1	<i>Pseudomonas</i> sp. (AF326381)	Sedimento de arroyo	98	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	97
12DNK67	1	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (KP125967)	Planta	97	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	97
12DNK42	1	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (KP125967)	Planta	97	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	99
12DNK9	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	97	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	97
12DNK12	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	97	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	99
Firmicutes						
12DNK8	1	<i>Clostridium</i> sp. (JF346753)	Sedimento subterráneo	99	<i>Clostridium huakuii</i> (KC967412)	99
12DNK6	1	<i>Clostridium</i> sp. (JF346753)	Sedimento subterráneo	99	<i>Clostridium huakuii</i> (KC967412)	99
Betaproteobacteria						
12DNK10	1	<i>Ralstonia eutropha</i> (AM260480)	Suelo	97	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	97

Tabla 3.4 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias metabólicamente activas obtenidas del cultivo de enriquecimiento de color negro en medio Rouf modificado de la muestra 0212T2A (49 secuencias, 21 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Gammaproteobacteria						
12RNK40	28	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	100	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	100
12RNK51	2	<i>Pseudomonas putida</i> (JF825523)	Zona industrial	98	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	98
12RNK104	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	98	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	99
12RNK52	1	<i>Pseudomonas</i> sp. (KF578426)	Suelo de gasolinera	95	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	98
12RNK69	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	99	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	99
12RNK71	1	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (KP125967)	Planta	98	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	98
12RNK85	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	97	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	97
12RNK92	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	98	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	98
12RNK94	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	99	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	98
12RNK3	1	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (KP125967)	Planta	94	<i>Pseudomonas marginalis</i> (AJ308309)	94
12RNK116	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	97	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	98
12RNK118	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	94	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	97
12RNK121	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	97	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	97
12RNK8	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	93	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	93
12RNK17	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	98	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	98
12RNK32	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	97	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	97
12RNK42	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	98	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	99
12RNK48	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF703662)	Suelo contaminado	97	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	98
12RNK31	1	<i>Pseudomonas putida</i> (JF825523)	Zona industrial	98	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (AF468450)	98
Firmicutes						
12RNK73	1	Firmicutes no cultivado (AM713394)	Mina de cobre	97	<i>Desulfosporosinus meridiei</i> (AGJA01000003)	97
Betaproteobacteria						
12RNK38	1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (AY512626)	Suelo contaminado	98	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	96

Tabla 3.5 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias totales obtenidas del cultivo de enriquecimiento de color negro en medio Rouf modificado de la muestra 0313T2A (47secuencias, 21 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Betaproteobacteria						
13DNK55	22	<i>Herbaspirillum</i> sp. no cultivado (AM936250)	Suelo contaminado con hidrocarburos	97	<i>Noviherbaspirillum canariense</i> (HQ830496)	96
13DNK49	3	Bacteria no cultivada (AM116727)	Suelo de mina de uranio	98	<i>Duganella phyllosphaerae</i> (FR852575)	96
13DNK88	2	Bacteria no cultivada (EU799250)	Newport Harbor (EE.UU.)	95	<i>Noviherbaspirillum aurantiacum</i> (HQ830497)	95
13DNK6	1	Bacteria no cultivada (AB608665)	Suelo de arrozal	97	<i>Noviherbaspirillum canariense</i> (HQ830496)	95
13DNK68	1	Bacteria no cultivada (EU799250)	Newport Harbor (EE.UU.)	95	<i>Noviherbaspirillum aurantiacum</i> (HQ830497)	94
13DNK43	1	Bacteria no cultivada (EU331383)	Sedimento contaminado	94	<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i> (Y08845)	94
13DNK95	1	Bacteria no cultivada (EU331383)	Sedimento contaminado	94	<i>Herminiimonas contaminans</i> (HE610501)	93
13DNK91	1	<i>Azoarcus</i> sp. (Y13222)	Lodo activado	96	<i>Azoarcus anaerobius</i> (Y14701)	94
13DNK90	1	Bacteria no cultivada (AM116727)	Suelo de mina de uranio	96	<i>Duganella phyllosphaerae</i> (FR852575)	94
13DNK4	1	Bacteria no cultivada (AM116727)	Suelo de mina de uranio	96	<i>Paraherbaspirillum soli</i> (FJ812351)	95
13DNK20	1	<i>Cupriavidus</i> sp. (AB266612)	Suelo con pesticidas	99	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	99
Firmicutes						
13DNK58	2	<i>Bacillus toyonensis</i> (CP006863)	Suelo	98	<i>Bacillus toyonensis</i> (CP006863)	98
13DNK59	1	<i>Bacillus</i> sp. (HM567157)	Estiércol	94	<i>Bacillus mycoides</i> (ACMU01000002)	94
13DNK72	1	<i>Paenibacillus</i> sp. (JQ966213)	Turba	98	<i>Paenibacillus terrigena</i> (AB248087)	97
13DNK33	1	Bacteria no cultivada (AB630531)	Musgo acuático	97	<i>Clostridium tagluense</i> (DQ296031)	97
13DNK21	1	<i>Bacillus</i> sp. (HM567157)	Suelo	90	<i>Bacillus toyonensis</i> (CP006863)	89
13DNK18	1	<i>Clostridium tunisiense</i> (AY187622)	Aguas residuales	98	<i>Clostridium sulfidigenes</i> (EF199998)	97
Gammaproteobacteria						
13DNK44	2	Bacteria no cultivada (DQ264531)	Aguas subterráneas	93	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i> (ARFU01000016)	91
13DNK54	1	<i>Pseudomonas jessenii</i> (HF584784)	Raíces de la vid	99	<i>Pseudomonas jessenii</i> (AF068259)	99
13DNK17	1	<i>Acinetobacter</i> sp. (JN609536)	Intestinos	98	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i> (ARFU01000016)	98
Nitrospirae						
13DNK8	1	Nitrospirae no cultivado (HF584515)	Tumbas etruscas	85	<i>Nitrospira calida</i> (HM485589)	86

Tabla 3.6 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias metabólicamente activas obtenidas del cultivo de enriquecimiento de color negro en medio Rouf modificado de la muestra 0313T2A (46 secuencias, 24 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Betaproteobacteria						
13RNK14	7	<i>Herbaspirillum</i> sp. no cultivado (AM936250)	Suelo contaminado con hidrocarburos	98	<i>Noviherbaspirillum canariense</i> (HQ830496)	96
13RNK12	4	Bacteria no cultivada (AM116727)	Suelo de mina de uranio	97	<i>Janthinobacterium agaricidamnorum</i> (Y08845)	96
13RNK38	2	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	Suelo	99	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	99
13RNK9	2	Bacteria no cultivada (AM116727)	Suelo de mina de uranio	97	<i>Noviherbaspirillum suwonense</i> (JX275858)	96
13RNK32	1	Bacteria no cultivada (FN356499)	Terreno en barbecho	93	<i>Variovorax soli</i> (DQ432053)	91
13RNK34	1	<i>Oxalobacteraceae</i> no cultivada (AY360650)	Suelo de arrozal	88	<i>Massilia haematophila</i> (AM774589)	88
13RNK6	1	Bacteria no cultivada (HM481367)	Suelo contaminado	92	<i>Janthinobacterium agaricidamnorum</i> (Y08845)	91
13RNK80	1	Bacteria no cultivada (AM116727)	Suelo de mina de uranio	99	<i>Duganella phyllosphaerae</i> (FR852575)	96
13RNK10	1	Bacteria no cultivada (AB608665)	Suelo de arrozal	95	<i>Noviherbaspirillum canariense</i> (HQ830496)	95
13RNK86	1	Bacteria no cultivada (EU799250)	Newport Harbor (EE.UU.)	95	<i>Noviherbaspirillum canariense</i> (HQ830496)	95
13RNK64	1	Bacteria no cultivada (AM116727)	Suelo de mina de uranio	92	<i>Janthinobacterium agaricidamnorum</i> (Y08845)	91
13RNK88	1	Bacteria no cultivada (HQ119381)	Arena arcillosa	95	<i>Massilia niabensis</i> (EU808006)	95
Firmicutes						
13RNK23	10	<i>Clostridium tunisiense</i> TJ (AY187622)	Aguas residuales	98	<i>Clostridium sulfidigenes</i> (EF199998)	97
13RNK93	2	Bacteria no cultivada (GQ983154)	Suelo de arrozal	99	<i>Clostridium tagluense</i> (DQ296031)	98
13RNK25	2	<i>Bacillus thuringiensis</i> (HF585017)	Raíces de la vid	99	<i>Bacillus toyonensis</i> (CP006863)	100
13RNK65	1	<i>Bacillus</i> sp. (JF496860)	Suelo	98	<i>Bacillus toyonensis</i> (CP006863)	98
13RNK8	1	Bacteria no cultivada (FN433936)	Suelo agrícola	93	<i>Clostridium bowmanii</i> (AJ506120)	88
13RNK4	1	<i>Bacillus mycoides</i> (HF584834)	Raíces de la vid	92	<i>Bacillus gaemokensis</i> (FJ416489)	92
13RNK87	1	<i>Paenibacillus</i> sp. (JX154310)	Suelo bajo un roble	98	<i>Paenibacillus doosanensis</i> (JX233493)	95
13RNK19	1	<i>Clostridium</i> sp. no cultivado (HE575394)	Membrana osmótica	99	<i>Clostridium bowmanii</i> (AJ506120)	98
13RNK94	1	<i>Paenibacillus chondroitinus</i> (AM237395)	Polvo urbano	97	<i>Paenibacillus pocheonensis</i> (AB245386)	95

Mina de agua de Paranhos (Oporto, Portugal)

13RNK95	1	<i>Bacillus</i> sp. (HM567127)	Estiércol	96	<i>Bacillus mycoides</i> (ACMU01000002)	96
13RNK1	1	<i>Paenibacillus</i> sp. (AB257597)	Suelo	87	<i>Paenibacillus doosanensis</i> (JX233493)	89
Gammaproteobacteria						
13RNK35	1	Bacteria no cultivada (GU569120)	Nematodo de pino	95	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> (EU391388)	92

Tabla 3.7 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias totales obtenidas del cultivo de enriquecimiento de color marrón en medio Rouf modificado de la muestra 0313T2A (44 secuencias, 35 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Alphaproteobacteria						
13DMK-F8	6	<i>Ensifer</i> sp. (KR703512)	Prado salino natural	98	<i>Ensifer medicae</i> (CP000738)	98
13DMK-F12	3	<i>Aminobacter</i> sp. (FJ711220)	Cavernas Kartchner	99	<i>Aminobacter anthyllidis</i> (FR869633)	99
13DMK-E11	1	<i>Ensifer</i> sp. (KR703512)	Prado salino natural	94	<i>Ensifer medicae</i> (CP000738)	95
13DMK-E10	1	<i>Ensifer</i> sp. (KR703512)	Prado salino natural	94	<i>Hoeflea olei</i> (HG965759)	96
13DMK-G10	1	<i>Ensifer</i> sp. (KR703512)	Prado salino natural	93	<i>Hoeflea olei</i> (HG965759)	95
13DMK-G11	1	<i>Ensifer</i> sp. (KR703512)	Prado salino natural	87	<i>Hoeflea olei</i> (HG965759)	91
13DMK-D8	1	<i>Ensifer</i> sp. (KR703512)	Prado salino natural	91	<i>Hoeflea olei</i> (HG965759)	93
13DMK-F10	1	Bacteria no cultivada (GQ264291)	Depósito de residuos	94	<i>Lacibacterium aquatile</i> (HE795994)	87
13DMK-G9	1	<i>Ensifer</i> sp. (KR703512)	Prado salino natural	92	<i>Ensifer psoraleae</i> (EU618039)	95
13DMK-B9	1	<i>Ensifer</i> sp. (KR703512)	Prado salino natural	93	<i>Ensifer numidicus</i> (AY500254)	93
Betaproteobacteria						
13DMK-D10	3	<i>Cupriavidus</i> sp. (EU882153)	Aguas residuales	99	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	100
13DMK-E9	1	<i>Cupriavidus</i> sp. (EU882153)	Aguas residuales	93	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	95
13DMK-G12	1	<i>Cupriavidus</i> sp. (KM056762)	Sitio contaminado	98	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	99
13DMK-A7	1	<i>Cupriavidus</i> sp. (HQ540556)	Sedimento contaminado	92	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	93
13DMK-C7	1	<i>Cupriavidus</i> sp. (EU580710)	Cultivo de enriquecimiento con lodo de aguas residuales	94	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	95
13DMK-C10	1	<i>Cupriavidus</i> sp. (EU882153)	Aguas residuales	97	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	99
13DMK-C11	1	<i>Cupriavidus</i> sp. (JQ901426)	Suelo contaminado con Cd	97	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	97
13DMK-C12	1	<i>Cupriavidus</i> sp. (EU882153)	Aguas residuales	96	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	97
13DMK-H8	1	<i>Azoarcus</i> sp. (AF482683)	Ambiente contaminado	98	<i>Azoarcus evansii</i> (X77679)	98
13DMK-D7	1	<i>Herbaspirillum</i> sp. no cultivado (AM936250)	Suelo contaminado con hidrocarburos	93	<i>Herbaspirillum frisingense</i> (AECC01001472)	94
Acidobacteria						
13DMK-F11	1	Bacteria no cultivada (FJ004703)	Rizosfera	94	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634)	92
13DMK-E12	1	Bacteria no cultivada (FJ004666)	Suelo	97	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634)	94
13DMK-F9	1	Bacteria no cultivada (FJ004703)	Rizosfera	94	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634)	93

13DMK-H9	1	Bacteria no cultivada (FJ004666)	Suelo	94	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634)	92
13DMK-A9	1	Bacteria no cultivada (FJ004666)	Suelo	96	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634)	94
13DMK-B11	1	Bacteria no cultivada (DQ083321)	Pastos	95	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634)	93
13DMK-C8	1	Bacteria no cultivada (FJ004666)	Suelo	91	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634)	92
Fimicutes						
13DMK-D11	1	<i>Bacillus mycoides</i> (KR233766)	Glaciar	99	<i>Bacillus mycoides</i> (ACMU01000002)	100
13DMK-B7	1	Bacteria no cultivada (HM628136)	Biofilm microbiano	96	<i>Paenibacillus frigoriresistens</i> (JQ314346)	95
13DMK-A10	1	Bacteria no cultivada (AY524559)	Sedimento contaminado con uranio	90	<i>Paenibacillus contaminans</i> (EF626690)	90
13DMK-B12	1	<i>Bacillus</i> sp. (DQ983193)	Sedimento marino	97	<i>Bacillus anthracis</i> (AE016879)	96
13DMK-C9	1	<i>Desulfosporosinus lacus</i> (NR_042202)	Sedimento del lago Stechlin (Alemania)	93	<i>Desulfosporosinus lacus</i> (AJ582757)	96
13DMK-D9	1	<i>Pelosinus</i> sp. (FN689723)	Acuífero contaminado	99	<i>Pelosinus fermentans</i> (AKVN01000045)	99
Actinobacteria						
13DMK-E8	1	<i>Arthrobacter</i> sp. no cultivado (KJ605879)	Suelo de cultivo de azafrán en estado latente	95	<i>Arthrobacter oryzae</i> (AB279889)	98
13DMK-G7	1	<i>Arthrobacter pascens</i> (JX840974)	Suelo de la rizosfera	89	<i>Arthrobacter pascens</i> (X80740)	92

El análisis matemático de la distribución de las secuencias de los clones, mostró que las curvas de rarefacción generadas a nivel de especie, 97% de similitud, no llegaron a alcanzar la asíntota (Figura 3.8 A y B, Figura 3.9). Sin embargo, a nivel de género, 95% de similitud, la función ya tendía a esa estabilidad en el caso de los cultivos de enriquecimiento de la muestra 0313T2A, especialmente en el caso de la serie del ADN (Figura 3.8 B y Figura 3.9) y alcanzándose en todos los casos a nivel de filo, 80% de similitud (Figura 3.8 A y B, Figura 3.9).

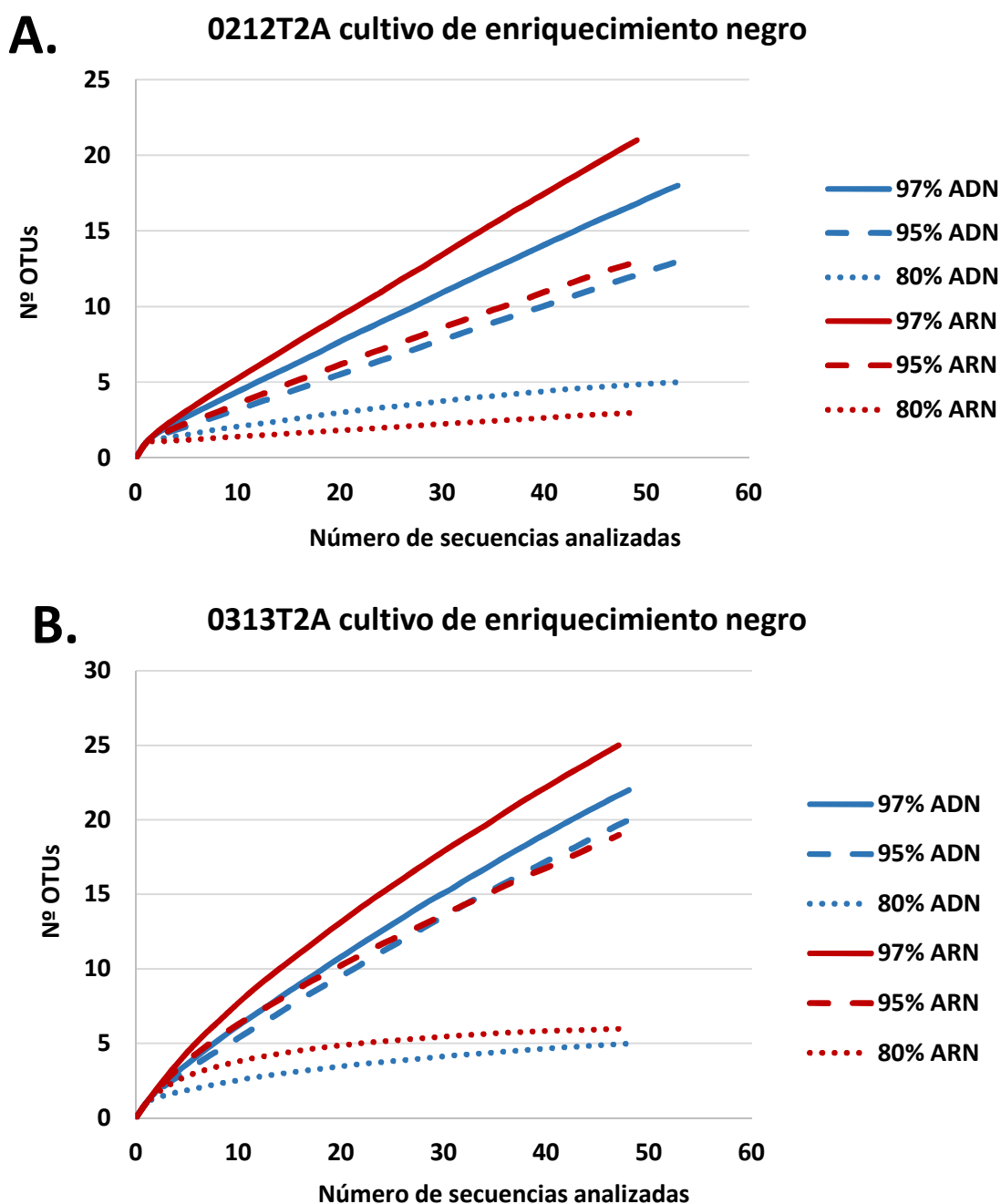


Figura 3.8 Curvas de rarefacción de los cultivos de enriquecimiento negro. A. Muestra 0212T2A. B. Muestra 0313T2A. Se representa el número de secuencias analizadas frente al número de OTUs generados a tres niveles de similitud: especie (97%), género (95%) y filo (80%). Genoteca de ADN (—). Genoteca de ARN (—).

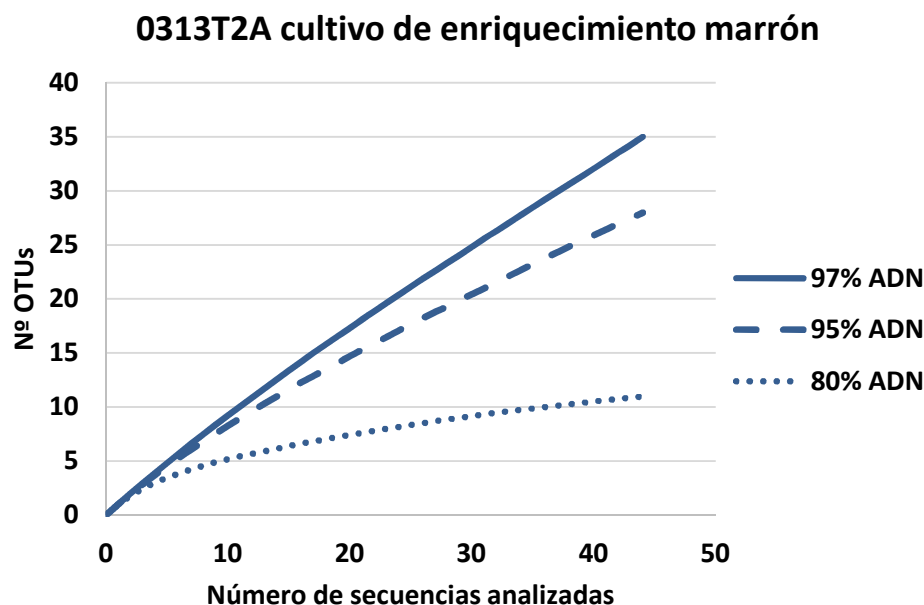


Figura 3.9 Curvas de rarefacción de los cultivos de enriquecimiento marrón de la muestra 0313T2A. Se representa el número de secuencias analizadas frente al número de OTUs generados a tres niveles de similitud: especie (97%), género (95%) y filo (80%). Genoteca de ADN (—).

Los cultivos de enriquecimiento de la muestra 0313T2A mostraron funciones con pendientes más suaves que los de la muestra 0212T2A, lo que indicó una mejor cobertura de la biodiversidad. Debido a que en ningún caso la riqueza a nivel de especie alcanzó la fase de saturación, mediante un mayor número de secuenciaciones se podrían detectar filotipos adicionales.

➤ Estudio de las comunidades bacterianas de las muestras naturales de depósitos negros 0212T2A y 0313T2A mediante genotecas de ADN y ARN

Se obtuvieron un total de 393 secuencias libres de quimeras de ambas muestras naturales de depósitos negros del túnel de Paranhos, con las que se construyeron genotecas independientes de ADN y ARN de cada una de ellas, con el fin de detectar las bacterias totales y las metabólicamente activas presentes en las muestras objeto de estudio.

La distribución de los diferentes filos en las muestras puede observarse en la Figura 3.10. El filo Proteobacteria fue el más abundante en ambas muestras, tanto en el análisis de las bacterias totales (47% en 0212T2A y 0313T2A) como en el de las metabólicamente activas (64% en 0212T2A y 69% en 0313T2A), distribuidas en las clases Alpha-, Beta-, Gamma- y Deltaproteobacteria.

La clase mayoritaria fue Alphaproteobacteria en el caso de 0313T2A, tanto para las secuencias de ADN (26%) como para las de ARN (34%).

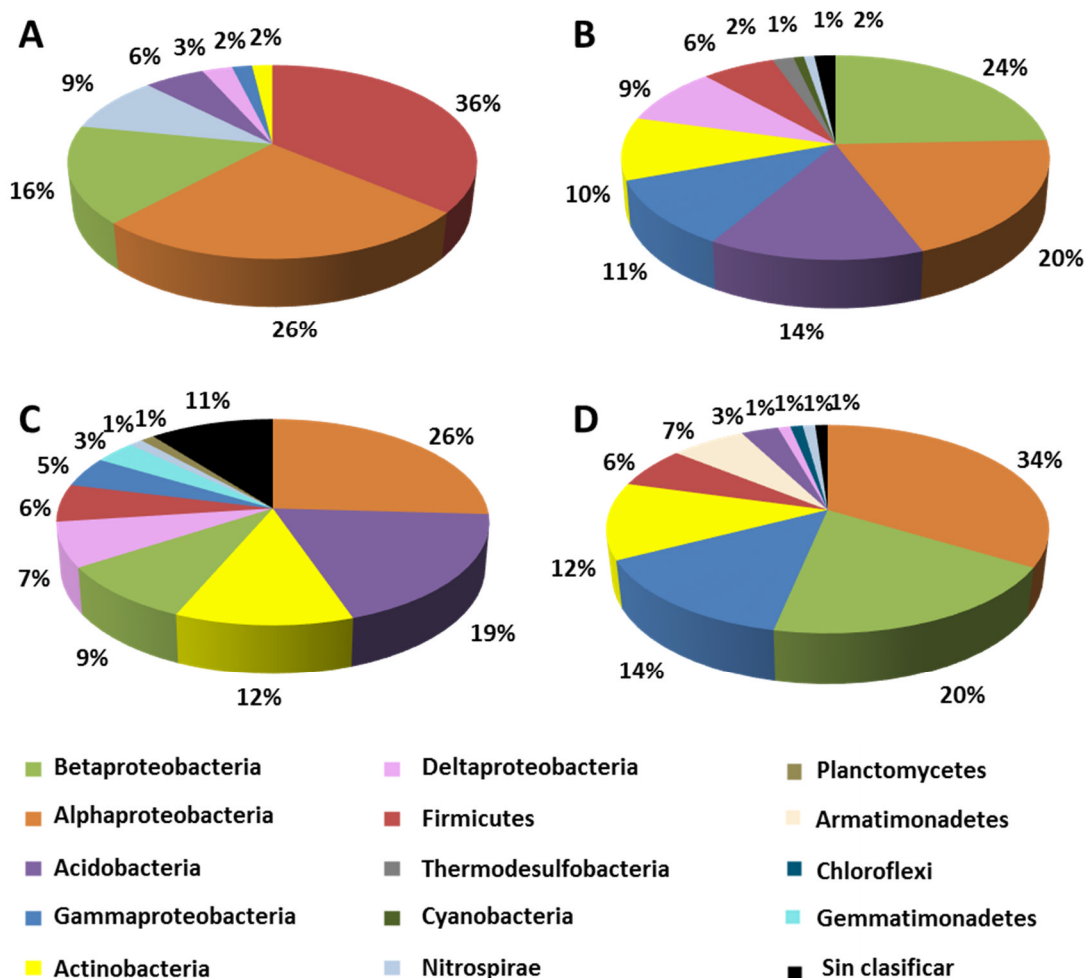


Figura 3.10 Distribución de filos en las muestras de depósitos negros de Oporto. A. Genoteca de ADN de 0212T2A. B. Genoteca de ARN de 0212T2A. C. Genoteca de ADN de 0313T2A. D. Genoteca de ARN de 0313T2A.

En la muestra 0212T2A, el grupo predominante varió según las secuencias estudiadas, siendo Firmicutes en las secuencias de ADN (36%) seguida por la clase Alphaproteobacteria (26%), y la clase Betaproteobacteria la predominante en las de ARN (24%).

Alphaproteobacteria fue, igualmente, la segunda clase más abundante de bacterias metabólicamente activas en la muestra 0212T2A. El segundo grupo predominante en el ADN de la muestra 0313T2A correspondió a Acidobacteria (19%), y en el ARN a la clase Betaproteobacteria (20%). El filo Acidobacteria estuvo bien representado en las bacterias metabólicamente activas de la muestra 0212T2A, con un 14%.

Se detectaron Actinobacteria en las dos muestras, siendo en 0313T2A donde llegó a alcanzar un porcentaje más elevado (12% tanto para el ADN como el ARN). También se identificaron otros filos con bajos porcentajes. Las bacterias metabólicamente activas de 0212T2A correspondieron a Thermodesulfobacteria (2%),

Cyanobacteria (1%) y Nitrospirae (1%), a pesar de que éste último filo sí estuvo bien representado en las bacterias totales con un 9% del total. La muestra 0313T2A fue la única en la que se detectó Planctomycetes (1% en el ADN) y Chloroflexi (1% en el ARN). En las bacterias totales de la muestra 0313T2A hubo un mayor porcentaje de ellas sin clasificación (11%), ya que su similitud fue menor del 80% (Eztaxon), lo que no permitió una afiliación aproximada.

Las identificaciones de las 216 secuencias obtenidas de la muestra 0212T2A se presentan en las Tablas 3.8 y 3.9. Las 105 secuencias correspondientes a las bacterias totales se distribuyeron en 53 OTUs (Tabla 3.8), y 111 secuencias correspondientes a bacterias metabólicamente activas en 78 OTUs (Tabla 3.9).

El filo Firmicutes fue el más abundante en las bacterias totales de la muestra 0212T2A con un 36%, siendo *Bacillus cereus*/*Bacillus weihenstephanensis* las especies representativas y las más abundantes en la muestra (32,4%). Dentro de Alphaproteobacteria destaca la especie *Hyphomicrobium aestuarii* (21,9%), que fue la segunda más detectada en estos clones. La clase Betaproteobacteria estuvo representada únicamente por *Cupriavidus necator* (1,9%), con similitudes elevadas, mientras que otras secuencias presentaron similitudes bajas que no permiten una adscripción a géneros o especies. Prácticamente todas las secuencias afiliadas al filo Nitrospirae pertenecían a la especie *Nitrospira moscoviensis* (un 80% de ellas). Los grupos taxonómicos minoritarios correspondieron a Acidobacteria (6%), Deltaproteobacteria (3%), Gammaproteobacteria (2%), y Actinobacteria (2%), con secuencias con similitudes tan bajas que no permiten ninguna afiliación.

En el caso de las bacterias metabólicamente activas de la muestra 0212T2A (Tabla 3.9), no hubo ninguna especie que fuera detectada en un porcentaje mucho mayor respecto a las demás. Entre las Alphaproteobacteria se identificó *Hyphomicrobium aestuarii*, que volvió a estar representada (6,3%), aunque con un porcentaje mucho menor con respecto a las bacterias totales. Por primera vez se localizó la especie *Pedomicrobium manganicum* (2,7%), perteneciente también a Alphaproteobacteria, aunque con una similitud de solo el 96%. Dentro de Betaproteobacteria, se detectó a *Cupriavidus necator* junto a especies de los géneros *Nitrosomonas*, *Ideonella* y *Thauera*. La clase Gammaproteobacteria tuvo una mayor representación que en las bacterias totales, conteniendo el género *Acinetobacter*. El 10% de actinobacterias correspondió a 11 secuencias, representadas por *Rubrobacter* y *Propionibacterium*. Entre las secuencias de Firmicutes, solo la asignada a *Blautia producta* alcanzó una similitud del 96%. Las secuencias incluidas inicialmente en otros fillos y clases, como Acidobacteria, Deltaproteobacteria, Thermodesulfobacteria, Cyanobacteria y Nitrospirae, no pudieron ser asignadas a géneros o especies.

Las identificaciones de las 177 secuencias obtenidas de la muestra 0313T2A se muestran en las Tablas 3.10 y 3.11. Se obtuvieron 85 secuencias de

bacterias totales distribuidas en 84 OTUs (Tabla 3.10), y 92 secuencias de bacterias metabólicamente activas en 56 OTUs (Tabla 3.11).

La clase Alphaproteobacteria fue la más abundante en las bacterias totales de la muestra 0313T2A, abarcando las secuencias una gran cantidad de afiliaciones. Entre estas se encontraron *Pedomicrobium australicum*, *Hyphomicrobium vulgare*, *Methylocapsa aurea* y *Beijerinckia derxii* subsp. *venezuelae*, con un porcentaje de similitud entre el 96 y 95%. Los demás filos y clases presentaron, en general, secuencias por debajo del 90%, lo que impide su afiliación.

La clase Alphaproteobacteria fue el grupo filogenético más abundante en las bacterias metabólicamente activas de la muestra 0313T2A, estando representada por el género *Sphingomonas*, al que se afiliaron el 8,7% de las secuencias y otras muchas especies, con un significativo porcentaje de similitud, en su mayoría por encima del 97%. Aparece además la especie *Hyphomicrobium facile*, sumando otro representante del género *Hyphomicrobium* en estas muestras. Betaproteobacteria fue la segunda clase más abundante (20%), cuyos representantes comprendieron las especies *Methylibium petroleiphilum* y *Aquabacterium commune*. Gammaproteobacteria estuvo representada por *Pseudomonas koreensis* y *Pseudomonas hibiscicola* (6,5%) y Actinobacteria por *Micrococcus luteus* y *Propionibacterium acnes*. Firmicutes (6%), estuvo representado por *Brochothrix thermosphacta*. Los grupos minoritarios correspondieron en este caso a Armatimonadetes, Acidobacteria, Deltaproteobacteria, Chloroflexi y Nitrospirae, con secuencias con bajas similitudes.

Además, las secuencias obtenidas de las muestras naturales de los depósitos negros de Oporto y sus identificaciones se analizaron según su procedencia, atendiendo a los datos del NCBI (Tablas 3.8 – 3.11). El 15,3% del total correspondió a bacterias procedentes de biofilms microbianos presentes en tubos de lava, un 9,2% a bacterias de pinturas murales etruscas, un 5% a bacterias de suelos contaminados, un 4,8% a bacterias de otros biofilms microbianos, un 3,8% a bacterias procedentes del propio túnel de granito de Paranhos, un 3,3% a bacterias de costras negras de ferromanganeso, un 3% a bacterias de cuevas y un 1,3% a bacterias de minas. El 54,3% restante englobó a bacterias procedentes de diferentes tipos de suelos, aguas subterráneas, sedimentos, etc. Prácticamente la totalidad de las fuentes de aislamiento pertenecieron a bacterias no cultivadas.

Las bacterias de todas las genotecas muestran similitudes con los biofilms de tubos de lava, a excepción de las bacterias metabólicamente activas de 0313T2A. La procedencia de depósitos rojos en las paredes de granito del propio túnel de Oporto estuvo también representada en las mismas genotecas que los tubos de lava. Además de los tubos de lava y las cuevas volcánicas, entre las cuevas de las que proceden algunas bacterias de estas muestras se encuentran la Cueva de Altamira

(España), la Cueva Magura (Bulgaria), la Cueva Roraima Sur (Venezuela), las Cavernas Kartchner (EE.UU.) y el Monumento Nacional Cuevas de Oregón (EE.UU).

Por otra parte, la mayoría de las secuencias procedentes de costras negras de ferromanganeso también aparecieron en la Cueva de Altamira, además de muchos de los biofilms microbianos, presentes a su vez en las paredes de otros ambientes subterráneos, como el sistema de Cuevas Frasassi (Italia).

Las minas de las que proceden algunas de las cepas similares a las encontradas en este trabajo bacterias son diversas, entre las que se encuentran minas de cobre, oro y arsénico.

Las especies procedentes de suelos contaminados también presentan similitudes, aunque en un porcentaje mucho menor que el obtenido en las muestras de los cultivos de enriquecimiento, apareciendo de nuevo asociados al género *Cupriavidus* sp., junto a bacterias no cultivadas pertenecientes a *Nitrospira* sp.

Tabla 3.8 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias totales obtenidas de la muestra 0212T2A (105 secuencias, 53 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Firmicutes						
12DK-H6	30	<i>Bacillus cereus</i> (KM036070)	Suelo de madera de edificio histórico	99	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (BAUY01000093)	100
12DK147	4	<i>Bacillus cereus</i> (KM036070)	Suelo de madera de edificio histórico	99	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (BAUY01000093)	100
12DK-F8	1	Bacteria no cultivada (HM445385)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Heliobacillus mobilis</i> (AB100835)	82
12DK134	1	<i>Bacillus mycoides</i> (KT922012)	Raíces de halófitas	99	<i>Bacillus mycoides</i> (ACMU01000002)	99
12DK127	1	<i>Bacillus mycoides</i> (LN774166)	Muestra de aire	96	<i>Bacillus mycoides</i> (ACMU01000002)	98
12DK-H1	1	Bacteria no cultivada (EU491440)	Lava del fondo marino	94	<i>Hydrogenispora ethanolica</i> (AB669474)	82
Alphaproteobacteria						
12DK-G11	18	Alphaproteobacteria no cultivada (HG379959)	Pintura mural etrusca	99	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> (Y14304)	99
12DK-C4	2	Alphaproteobacteria no cultivada (HG379959)	Pintura mural etrusca	95	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> (Y14304)	95
12DK113	2	Bacteria no cultivada (HM445365)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> (Y14304)	99
12DK98	1	Deltaproteobacteria no cultivada (HG325786)	Depósito rojo en túnel de granito	98	<i>Lacibacterium aquatile</i> (HE795994)	83
12DK105	1	Alphaproteobacteria no cultivada (HG379959)	Pintura mural etrusca	99	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> (Y14304)	99
12DK112	1	Bacteria no cultivada (JN607004)	Biofilm en tubo de lava	100	<i>Skermanella stibiirens</i> (HQ315828)	92
12DK118	1	Alphaproteobacteria no cultivada (HE613605)	Costra negra de ferromanganeso	98	<i>Dongia mobilis</i> (FJ455532)	92
12DK179	1	Bacteria no cultivada (JN615922)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Dongia mobilis</i> (FJ455532)	93
Betaproteobacteria						
12DK138	1	Betaproteobacteria no cultivada (HE974851)	Suelo contaminado	99	<i>Georgfuchsia toluolica</i> (EF219370)	91
12DK162	1	Betaproteobacteria no cultivada (FJ535112)	Biofilm de una cueva	99	<i>Sterolibacterium denitrificans</i> (AJ306683)	91
12DK135	1	Betaproteobacteria no cultivada	Suelo contaminado	99	<i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i> (AB552842)	91

		(HE974851)				
12DK174	1	Bacteria no cultivada (DQ499321)	Biofilm microbiano	99	<i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i> (AB552842)	90
12DK149	1	Bacteria no cultivada (JF266304)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Azoarcus olearius</i> (EF158388)	91
12DK184	1	Bacteria no cultivada (JF266304)	Biofilm en tubo de lava	100	<i>Azoarcus olearius</i> (EF158388)	92
12DK97	1	Bacteria no cultivada (JF266304)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Azoarcus olearius</i> (EF158388)	91
12DK163	1	<i>Cupriavidus</i> sp. (GU167923)	Área de mina de cobre	98	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	98
12DK128	1	<i>Cupriavidus</i> sp. (JX233515)	Suelo contaminado	99	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	99
12DK137	1	Bacteria no cultivada (HE856830)	Lago Aixeus (España)	96	<i>Undibacterium oligocarboniphilum</i> (GQ379228)	95
12DK107	1	Bacteria no cultivada (HE653842)	Cueva Magura	100	<i>Steroidobacter denitrificans</i> (EF605262)	88
12DK-E1	1	Betaproteobacteria no cultivada (HE604299)	Costra negra de ferromanganeso	99	<i>Thiobacter subterraneus</i> (AB180657)	90
12DK-G10	1	Bacteria no cultivada (HM125444)	Suelo	98	<i>Georgfuchsia toluolica</i> (EF219370)	90
12DK-B2	1	Bacteria no cultivada (DQ499321)	Biofilm microbiano	99	<i>Georgfuchsia toluolica</i> (EF219370)	91
12DK-H2	1	Betaproteobacteria no cultivada (HE974851)	Suelo contaminado	99	<i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i> (AB552842)	91
12DK-G12	1	Bacteria no cultivada (HQ863981)	Suelo alpino	99	<i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i> (AB552842)	93
12DK-H10	1	<i>Sterolibacterium</i> sp. (AM990454)	Agua ultrapura	99	<i>Georgfuchsia toluolica</i> (EF219370)	91
Nitrospirae						
12DK-D12	2	<i>Nitrospira</i> sp. no cultivado (JN802217)	Biofilm	99	<i>Nitrospira moscoviensis</i> (X82558)	97
12DK-B8	1	Bacteria no cultivada (JN592668)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Nitrospira moscoviensis</i> (X82558)	96
12DK151	1	Bacteria no cultivada (JN672474)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Nitrospira moscoviensis</i> (X82558)	95
12DK168	1	Bacteria no cultivada (JN802364)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Nitrospira moscoviensis</i> (X82558)	95
12DK169	1	Bacteria no cultivada (JN802364)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Nitrospira moscoviensis</i> (X82558)	96
12DK157	1	Bacteria no cultivada (JN616006)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Nitrospira moscoviensis</i> (X82558)	95
12DK103	1	<i>Nitrospira</i> sp. no cultivado (HE974818)	Suelo contaminado	94	<i>Nitrospira moscoviensis</i> (X82558)	92
12DK154	1	<i>Bacteria no cultivada</i> (HM445396)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Nitrosospira lacus</i> (CAUA01000011)	90
12DK-F12	1	<i>Nitrospira</i> sp. no cultivado (EF019838)	Rizosfera de álamo	99	Candidatus <i>Nitrospira defluvii</i> (DQ059545)	99
Acidobacteria						
12DK142	1	Acidobacteria no cultivada (DQ139449)	Catacumba romana	96	<i>Acidicapsa borealis</i> (FR774763)	84
12DK158	1	Bacteria no cultivada (HM445365)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Aridibacter kavangonensis</i> (KF245633)	90
12DK145	1	Bacteria no cultivada (HM445365)	Biofilm en tubo de lava	95	<i>Aridibacter kavangonensis</i> (KF245633)	88
12DKH5	1	Bacteria no cultivada (JQ426716)	Suelo salino alcalino	98	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	84
12DK187	1	Bacteria no cultivada (JF265892)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Terriglobus tenax</i> (JN543507)	85

Capítulo 3

12DK-E2	1	Bacteria no cultivada (HM445365)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Aridibacter kavangonensis</i> (KF245633)	90
Deltaproteobacteria						
12DK178	1	Bacteria no cultivada (HM187124)	Sedimento subterráneo	95	<i>Polyangium fumosum</i> (GU207879)	84
12DK170	1	Bacteria no cultivada (HM187124)	Sedimento subterráneo	98	<i>Polyangium fumosum</i> (GU207879)	85
12DK-F4	1	Bacteria no cultivada (JF265699)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Pelobacter carbinolicus</i> (CP000142)	85
Gammaproteobacteria						
12DK182	1	Bacteria no cultivada (FQ659296)	Suelo contaminado	99	<i>Povalibacter uvarum</i> (AB548216)	88
12DK150	1	Gammaproteobacteria no cultivada (HG325796)	Depósito rojo en túnel de granito	99	<i>Acidiferrobacter thiooxydans</i> (AF387301)	88
Actinobacteria						
12DK-G4	1	Bacteria no cultivada (HM186577)	Sedimento subterráneo	95	<i>Virgisporangium aliadipatigenens</i> (AB548616)	80
12DK-H12	1	Bacteria no cultivada (EU132496)	Suelo de pradera	97	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	93

Tabla 3.9 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias metabólicamente activas obtenidas de la muestra 0212T2A (111 secuencias, 78 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Betaproteobacteria						
12RK-G12	3	<i>Azoarcus toluclasticus</i> (KJ000885)	Suelo	99	<i>Azoarcus toluclasticus</i> (AF123077)	98
12RK-A9	3	Bacteria no cultivada (HM187073)	Sedimento subterráneo	99	<i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i> (AB552842)	91
12RK-F1	3	Bacteria no cultivada (EF101830)	Suelo contaminado	99	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	99
12RK-F11-2	3	Betaproteobacteria no cultivada (HE604299)	Costra negra de ferromanganeso	99	<i>Thiobacter subterraneus</i> (AB180657)	90
12RK-H10	2	Bacteria no cultivada (JF266304)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Azoarcus olearius</i> (EF158388)	91
12RK-F12	2	Bacteria no cultivada (JX120407)	Sedimento subterráneo	99	<i>Georgfuchsia toluolica</i> (EF219370)	91
12RK-G5	2	Bacteria no cultivada (EU133837)	Suelo	97	Candidatus <i>Nitrotoga arctica</i> (DQ839562)	93
12RK-C9-2	1	Bacteria no cultivada (JF266304)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Cupriavidus gilardi</i> (EU024163)	90
12RK-A12-2	1	Bacteria no cultivada (JF266304)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Azoarcus olearius</i> (EF158388)	90
12RK-H8-2	1	<i>Burkholderiaceae</i> no cultivado (AM935782)	Suelo contaminado con hidrocarburos	98	<i>Cupriavidus gilardii</i> (EU024163)	90
12RK-A8-2	1	Bacteria no cultivada (DQ499321)	Biofilm microbiano	99	<i>Georgfuchsia toluolica</i> (EF219370)	91
12RK-D7	1	Bacteria no cultivada (JN245868)	Aguas residuales	96	<i>Thauera aminoaromatica</i> (AJ315677)	96
12R-H8	1	Bacteria no cultivada (AY945882)	Biorreactor con fango	98	<i>Thauera aminoaromatica</i> (AJ315677)	97
12RK8-C4	1	Bacteria no cultivada (EU937892)	Biofilm oxidante de Fe	98	<i>Nitrosomonas oligotropha</i> (AJ298736)	98
12RK17-E4	1	Betaproteobacteria no cultivada (JF833874)	Suelo de una mina de potasio	97	<i>Thiobacillus aquaesulis</i> (U58019)	92
12RK32-C1	1	Bacteria no cultivada (GU454909)	Fermentador	98	<i>Ideonella dechloratans</i> (X72724)	97
Alphaproteobacteria						
12RK-G6	7	Alphaproteobacteria no cultivada (HG379959)	Pinturas murales etruscas	99	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> (Y14304)	99
12RK-E3	2	Bacteria no cultivada (DQ840467)	Agua de una mina	96	<i>Filomicrobium insigne</i> (EF117253)	90
12RK-F11	2	Bacteria no cultivada (JF265933)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Phenylobacterium koreense</i> (AB166881)	89
12RK-A11	2	Bacteria no cultivada (FJ478498)	Pradera	98	<i>Pedomicrobium manganicum</i> (X97691)	96
12RK-B12	1	Bacteria no cultivada (HM445247)	Biofilm en tubo de lava	98	Candidatus <i>Sphaeronema italicum</i> (AY428765)	90
12RK-D12-2	1	Alphaproteobacteria no cultivada	Suelo	91	<i>Filomicrobium insigne</i> (EF117253)	90

Capítulo 3

		(EU044406)				
12RK-D9	1	Bacteria no cultivada (FJ478538)	Pradera	99	<i>Mesorhizobium amorphae</i> (AF041442)	98
12RK-E8	1	<i>Hyphomicrobiaceae</i> no cultivado (JX545181)	Suelo	99	<i>Rhodoplanes elegans</i> (D25311)	95
12RK-H3	1	Alphaproteobacteria OR-84 (HM163284)	Sedimento contaminado	99	<i>Taonella mepensis</i> (JN693496)	100
12RK-A3	1	Bacteria no cultivada (AF293000)	Ferromanganeso	96	<i>Ferrovibrio denitrificans</i> (GQ365620)	91
12RK-F9	1	Alphaproteobacteria no cultivada (HE614737)	Mina de As y Au	100	<i>Pedomicrobium manganicum</i> (X97691)	96
12RK-F7	1	Bacteria no cultivada (EU133519)	Suelo	99	<i>Blastochloris sulfovirdis</i> (D86514)	94
12RK-H10-2	1	Bacteria no cultivada (EF492928)	Suelo sobre un nódulo de ferromanganeso	98	<i>Beijerinckia dextrii</i> subsp. <i>venezuelae</i> (AJ563934)	97
Acidobacteria						
12RK-E12	4	Bacteria no cultivada (HM187214)	Sedimento subterráneo	94	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	82
12RK-D1	1	Bacteria no cultivada (HM187214)	Sedimento subterráneo	94	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	81
12RK-B11	1	Bacteria no cultivada (HM187214)	Sedimento subterráneo	94	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	82
12RK-D11	1	Bacteria no cultivada (HM444871)	Biofilm en tubo de lava	99	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	83
12RK-H1	1	Acidobacteria no cultivada (HG325733)	Depósito rojo en túnel de granito	97	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	82
12RK-F8	1	Bacteria no cultivada (JF265992)	Biofilm en tubo de lava	99	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> (CP000473)	92
12RK-B1	1	Bacteria no cultivada (JN616225)	Biofilm en tubo de lava	99	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> (CP000473)	92
12RK-A1	1	Bacteria no cultivada (JQ923511)	Sistema de distribución de agua	99	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> (CP000473)	93
12RK-G3	1	Bacteria no cultivada (HM445365)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Aridibacter kavangonensis</i> (KF245633)	91
12RK-A11-2	1	Bacteria no cultivada (HM445365)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Aridibacter kavangonensis</i> (KF245633)	90
12RK-G10	1	Bacteria no cultivada (HM445550)	Biofilm en tubo de lava	97	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> (CP000473)	94
12RK-A6	1	Bacteria no cultivada (JN615917)	Biofilm, cueva volcánica	98	<i>Granulicella pectinivorans</i> (AM887757)	83
12RK-D9-2	1	Acidobacteria no cultivada (HG325733)	Depósito rojo en túnel de granito	99	<i>Acidicapsa ligni</i> (EU780204)	80
Gammaproteobacteria						
12RK-D5	5	Gammaproteobacteria no cultivada (HE613623)	Pinturas murales de tumbas etruscas	99	<i>Plasticicumulans lactativorans</i> (JN565849)	94
12RK-D2	4	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (AB859068)	No especificada	99	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (AIEL01000120)	100

12RK-A10	1	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (AB859068)	No especificada	99	<i>Acinetobacter oryzae</i> (GU954428)	99
12RK-G10	1	Gammaproteobacteria no cultivada (HE603166)	Biofilm de una cueva	99	<i>Acidibacter ferrireducens</i> (JX412366)	95
12RK-E10	1	Bacteria no cultivada (JN615760)	Biofilm, cueva volcánica	99	<i>Poalibacter uvarum</i> (AB548216)	89
Actinobacteria						
12RK-E7	3	Actinomycetales no cultivado (EU434898)	Cueva con pinturas rupestres	99	<i>Pseudonocardia alaniniphila</i> (EU722519)	95
12RK-G1	1	Bacteria no cultivada (JF265951)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Aquihabitans daechungensis</i> (JN033775)	83
12RK-G11	1	Bacteria no cultivada (JN037993)	Suelo salino-alcalino	98	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	83
12RK-E9	1	Bacteria no cultivada (JN701043)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	94
12RK-H9	1	Bacteria no cultivada (EU135344)	Suelo	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	82
12RK-E11	1	Bacteria no cultivada (HF584644)	Tumba etrusca	99	<i>Rubrobacter xylanophilus</i> (CP000386)	100
12RK-D10	1	Bacteria no cultivada (EU134201)	Suelo	98	<i>Rubrobacter taiwanensis</i> (AF465803)	82
12RKB11-2	1	Bacteria no cultivada (DQ347868)	Suelo de un termitero	99	<i>Marmoricola bigeumensis</i> (EF466120)	98
12RK-F3	1	<i>Propionibacterium</i> sp. (GQ099596)	Hueso humano	99	<i>Propionibacterium acnes</i> (AWZZ01000008)	99
Deltaproteobacteria						
12RK-F4	1	Bacteria no cultivada (JX967620)	Suelo	97	<i>Pelobacter venetianus</i> (U41562)	85
12RK-D12	1	Bacteria no cultivada (JF266398)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Pelobacter acetylenicus</i> (X70955)	85
12RK-H11	1	Deltaproteobacteria no cultivada (AM934955)	Suelo contaminado con hidrocarburos	97	<i>Pelobacter venetianus</i> (U41562)	84
12RK-H7	1	Bacteria no cultivada (JF266398)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Pelobacter acetylenicus</i> (X70955)	85
12RK-A7	1	Bacteria no cultivada (HQ677574)	Suelo contaminado	99	<i>Desulfomonile tiedjei</i> (CP003360)	86
12RK-G8	1	Bacteria no cultivada (JN615833)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Desulfomonile tiedjei</i> (CP003360)	85
12RK-A12	1	Bacteria no cultivada (HM445104)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Desulfacinum infernum</i> (L27426)	85
12RK-A2	1	Deltaproteobacteria no cultivada (HF584697)	Pinturas murales de tumbas etruscas	96	<i>Desulfomicrobium macestii</i> (AJ237604)	82
12RK-B6	1	Deltaproteobacteria no cultivada (HF584697)	Pinturas murales de tumbas etruscas	98	<i>Desulfomicrobium macestii</i> (AJ237604)	81
12RK-A8	1	Bacteria no cultivada (JN801082)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Geopsychrobacter electrodiphilus</i> (AY187303)	84
Firmicutes						
12RK-B8	1	Bacteria no cultivada (FJ479422)	Pradera	98	<i>Desulfotomaculum thermocisternum</i> (U33455)	81
12RK-B3	1	Bacteria no cultivada (FJ478482)	Pradera	98	<i>Desulfotomaculum thermocisternum</i>	82

Capítulo 3

12RK-B2	1	Firmicutes no cultivado (HG325753)	Depósito rojo en túnel de granito	99	(U33455) <i>Gracilibacter thermotolerans</i> (DQ117465)	81
12RK-G8	1	Bacteria no cultivada (JN615833)	Biofilm, cueva volcánica	98	<i>Tepidibacter thalassicus</i> (AY158079)	82
12RK-E2	1	Bacteria no cultivada (JN559613)	Heces de hiena	99	<i>Blautia producta</i> (X94966)	96
12RK-E1	1	Bacteria no cultivada (JN559613)	Suelo	97	<i>Thermobrachium celere</i> (X99238)	83
12RK-F9-2	1	Bacteria no cultivada (JF703389)	Suelo	95	<i>Natranaerobaculum magadiense</i> (HQ322118)	81
Thermodesulfobacteria						
12RK-B9	2	Bacteria no cultivada (JF265954)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Thermosulfurimonas dismutans</i> (JF346116)	81
Cyanobacteria						
12RK-C11	1	Bacteria no cultivada (JQ624979)	Biomasa de álamo	98	<i>Phormidium lumbricale</i> (AF218375)	82
Nitrospirae						
12RK-C8	1	Bacteria no cultivada (KC358517)	Agua de caverna	96	<i>Methylobacterium oxyfera</i> (FP565575)	87
Bacterias sin clasificar*						
12RK-C9	1	Bacteria no cultivada (HM187237)	Suelo	97	-	-
12RK-E12-2	1	Bacteria no cultivada (JN615914)	Biofilm, cueva volcánica	87	-	-

*No fue posible clasificar los OTUs con un porcentaje de similitud menor del 80% (EZtaxon), por lo que no se especifica la especie cultivada más cercana.

Tabla 3.10 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias totales obtenidas de la muestra 0313T2A (85 secuencias, 84 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Alphaproteobacteria						
13DK-C7	2	Alphaproteobacteria no cultivada (GU205295)	Sedimento de la cueva Roraima Sur	98	<i>Beijerinckia derxii</i> subsp. <i>venezuelae</i> (AJ563934)	96
13DK-A2	1	Bacteria no cultivada (JN607004)	Biofilm en tubo de lava	96	<i>Skermanella stibiirensistens</i> (HQ315828)	89
13DK-A3	1	Alphaproteobacteria no cultivada (GU205295)	Sedimento de la cueva Roraima Sur	92	<i>Beijerinckia derxii</i> subsp. <i>venezuelae</i> (AJ563934)	94
13DK-A4	1	Alphaproteobacteria no cultivada (HG325776)	Depósito rojo en túnel de granito	94	<i>Pelagibius litoralis</i> (DQ401091)	89
13RK-A8	1	Alphaproteobacteria no cultivada (JN178897)	Cavernas Kartchner	96	<i>Blastochloris gulmargensis</i> (AM502287)	89
13DK-B3	1	Alphaproteobacteria no cultivada (HG325776)	Depósito rojo en túnel de granito	93	<i>Pelagibius litoralis</i> (DQ401091)	88
13DK-B10	1	Bacteria no cultivada (JN592703)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Hyphomicrobium vulgare</i> (Y14302)	95
13DK-G11	1	Bacteria no cultivada (JN801129)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Methylocapsa aurea</i> (JQK001000009)	95
13DK-D3	1	Alphaproteobacteria no cultivada (HE974830)	Suelo contaminado	97	Candidatus <i>Alysiosphaera europaea</i> (AY428766)	89
13DK-D4	1	Alphaproteobacteria no cultivada (HE603187)	Biofilm, pared de la Cueva de Altamira	93	<i>Skermanella aerolata</i> (DQ672568)	88
13DK-D8	1	Bacteria no cultivada (HE602868)	Biofilm de una cueva	94	<i>Methylocapsa aurea</i> (JQK001000009)	96
13DK-D10	1	Bacteria no cultivada (JQ426440)	Suelo	86	<i>Bauldia consociata</i> (FJ560750)	87
13DK-E1	1	Bacteria no cultivada (JX080256)	Yacimiento de gas	98	<i>Pedomicrobium australicum</i> (X97693)	96
13DK-F2	1	Alphaproteobacteria no cultivada (GU205295)	Sedimento de la cueva Roraima Sur	93	<i>Beijerinckia derxii</i> subsp. <i>venezuelae</i> (AJ563934)	95
13DK-F4	1	Bacteria no cultivada (HQ118355)	Suelo arcilloso	97	<i>Hyphomicrobium nitrativorans</i> (CP006912)	90
13DK-F8	1	Alphaproteobacteria no cultivada (FN297982)	Pared de calcarenita de tumba subterránea	96	Candidatus <i>Sphaeronema italicum</i> (AY428765)	90
13DK-F10	1	Bacteria no cultivada (HM445011)	Biofilm en tubo de lava	96	<i>Methylocapsa aurea</i> (JQK001000009)	96
13DK-G4	1	Bacteria no cultivada (HM445187)	Biofilm en tubo de lava	94	<i>Nisaea denitrificans</i> (AUFM01000008)	88
13DK-G10	1	Bacteria no cultivada (JN6158489)	Biofilm en tubo de lava	93	<i>Methyloceanibacter caenitepidi</i> (AB794104)	92

Capítulo 3

13DK-H4	1	Bacteria no cultivada (JF265849)	Biofilm en tubo de lava	94	<i>Methylocapsa aurea</i> (JQK001000009)	96
13DK-H10	1	Bacteria no cultivada (EU620177)	Suelo de matorral	92	<i>Filomicrobium fusiforme</i> (Y14313)	87
Acidobacteria						
13DK-A1	1	Acidobacteria no cultivada (HE604269)	Ferromanganeso	96	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634)	92
13DK-A7	1	Bacteria no cultivada (HM445365)	Biofilm en tubo de lava	92	<i>Aridibacter kavangonensis</i> (KF245633)	88
13DK-B5	1	Acidobacteria no cultivada (HQ597899)	Suelo de pradera	88	<i>Aridibacter kavangonensis</i> (KF245633)	85
13DK-B9	1	Bacteria no cultivada (HM187058)	Sedimento subterráneo	95	<i>Candidatus Koribacter versatilis</i> (CP000360)	82
13DK-C1	1	Acidobacteria no cultivada (HG325733)	Depósito rojo en túnel de granito	92	<i>Terriglobus tenax</i> (JN543507)	80
13DK-C2	1	Bacteria no cultivada (GQ500700)	Sedimento arenoso	95	<i>Heliophilum fasciatum</i> (L36197)	82
13DK-C9	1	Acidobacteria no cultivada (HG325733)	Depósito rojo en túnel de granito	95	<i>Acidobacterium capsulatum</i> (CP001472)	80
13DK-D1	1	Bacteria no cultivada (HM187058)	Sedimento subterráneo	93	<i>Candidatus Koribacter versatilis</i> (CP000360)	81
13DK-D6	1	Acidobacteria no cultivada (HQ597613)	Suelo de pradera	97	<i>Aridibacter kavangonensis</i> (KF245633)	88
13DK-D7	1	Bacteria no cultivada (HM445365)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Aridibacter kavangonensis</i> (KF245633)	89
13DK-E2	1	Bacteria no cultivada (LN680141)	Biofilm	91	<i>Pyrinomonas methylaliphato</i> genes (CBXV010000008)	84
13DK-E11	1	Bacteria no cultivada (HE602914)	Biofilm en la pared de una cueva	96	<i>Candidatus Chloracidobacterium thermophilum</i> (CP002514)	81
13DK-F7	1	Bacteria no cultivada (HE602914)	Biofilm en la pared de una cueva	95	<i>Pyrinomonas methylaliphato</i> genes (CBXV010000008)	83
13DK-F11	1	Acidobacteria no cultivada (HQ597613)	Suelo de pradera	98	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634)	89
13DK-G1	1	Acidobacteria no cultivada (HE604269)	Ferromanganeso	96	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634)	91
13DK-G2	1	Acidobacteria no cultivada (HQ597835)	Suelo de pradera	95	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634)	87
Actinobacteria						
13DK-A10	1	Bacteria no cultivada (KC331757)	Biofilm en tubo de lava	93	<i>Solirubrobacter taibaiensis</i> (KF551107)	84
13DK-C5	1	Actinobacteria no cultivada (HG325737)	Depósito rojo en túnel de granito	91	<i>Solirubrobacter pauli</i> (AY039806)	83
13DK-C10	1	Bacteria no cultivada (JQ663699)	Agua subterránea	95	<i>Conexibacter arvalis</i> (AB597950)	91
13DK-D9	1	Bacteria no cultivada (HM445549)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	94
13DK-E5	1	Bacteria no cultivada (HM445214)	Biofilm en tubo de lava	93	<i>Pseudonocardia petroleophila</i> (X80596)	92
13DK-F3	1	Bacteria no cultivada (JN616142)	Biofilm en tubo de lava	92	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	88
13DK-F12	1	Bacteria no cultivada (JN616142)	Biofilm en tubo de lava	96	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	91

13DK-H2	1	Bacteria no cultivada (JF167851)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	94	<i>Conexibacter arvalis</i> (AB597950)	90
13DK-H5	1	Bacteria no cultivada (JF167851)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	92	<i>Solirubrobacter ginsenosidimutans</i> (EU332825)	87
13DK-H6	1	Actinobacteria no cultivada (HG325738)	Depósito rojo en túnel de granito	92	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	88
Betaproteobacteria						
13DK-B2	1	Betaproteobacteria no cultivada (HE604299)	Biofilm negro de ferromanganeso	96	<i>Thiobacter subterraneus</i> (AB180657)	89
13DK-C3	1	Bacteria no cultivada (FJ478963)	Pradera	94	<i>Methylibium petroleiphilum</i> (CP000555)	94
13DK-C6	1	Betaproteobacteria no cultivada (HE604299)	Biofilm negro de ferromanganeso	94	<i>Sulfuritalea hydrogenivorans</i> (AB552842)	87
13DK-D11	1	Betaproteobacteria no cultivada (HE974851)	Suelo contaminado	97	<i>Georgfuchsia toluolica</i> (EF219370)	90
13DK-D12	1	Betaproteobacteria no cultivada (AM935649)	Suelo contaminado con hidrocarburos	90	<i>Piscinibacter aquaticus</i> (DQ664244)	85
13DK-E6	1	Bacteria no cultivada (JN616026)	Cueva volcánica	98	<i>Methylibium petroleiphilum</i> (CP000555)	89
13DK-E7	1	Betaproteobacteria no cultivada (HE604299)	Biofilm negro de ferromanganeso	95	<i>Burkholderia symbiotica</i> (HM357233)	89
13DK-G8	1	Betaproteobacteria no cultivada (HE604299)	Biofilm negro de ferromanganeso	95	<i>Schlegelella thermodepolymerans</i> (AY152824)	88
Deltaproteobacteria						
13DK-B6	1	Deltaproteobacteria no cultivada (JN825521)	Microbialitas	92	<i>Desulfohalobium utaense</i> (DQ067421)	83
13DK-B8	1	Bacteria no cultivada (EU160403)	Suelo de rizosfera	96	<i>Desulfomonile tiedjei</i> (CP003360)	84
13DK-C4	1	Deltaproteobacteria no cultivada (HG325782)	Depósito rojo en túnel de granito	94	<i>Geobacter luticola</i> (AB682759)	82
13DK-C8	1	Deltaproteobacteria no cultivada (JN825521)	Pinturas murales de tumbas etruscas	93	<i>Desulfovibrio alkalitolerans</i> (ATHI01000016)	80
13DK-D2	1	Deltaproteobacteria no cultivada (HG325782)	Depósito rojo en túnel de granito	94	<i>Hippea maritima</i> (CP002606)	80
13DK-H8	1	Bacteria no cultivada (JF266108)	Biofilm en tubo de lava	88	<i>Polyangium fumosum</i> (GU207879)	81
Firmicutes						
13DK-A5	1	Bacteria no cultivada (DQ123792)	Suelo contaminado	95	<i>Natranaerobius trueperi</i> (EU338490)	80
13DK-E8	1	Bacteria no cultivada (DQ123792)	Suelo contaminado	97	<i>Natranaerobius trueperi</i> (EU338490)	82

Capítulo 3

13DK-E9	1	<i>Cohnella</i> sp. (KR181825)	Suelo forestal	90	<i>Cohnella arctica</i> (HQ315787)	92
13DK-E12	1	Bacteria no cultivada (EU135322)	Suelo de pradera	97	<i>Thermaerobacter composti</i> (AB454087)	80
13DK-F9	1	Bacteria no cultivada (HM445296)	Biofilm en tubo de lava	91	<i>Thermaerobacter composti</i> (AB454087)	81
Gammaproteobacteria						
13DK-A12	1	Bacteria no cultivada (DQ823207)	Monumento Nacional Cuevas de Oregón	94	<i>Thioalkalivibrio sulfidiphilus</i> (CP001339)	89
13DK-B7	1	Bacteria no cultivada (JF266382)	Biofilm en tubo de lava	95	<i>Thioalkalivibrio denitrificans</i> (AF126545)	89
13DK-E4	1	Gammaproteobacteria no cultivada (HG325796)	Depósito rojo en túnel de granito	96	<i>Acidiferrobacter thiooxydans</i> (AF387301)	87
13DK-F1	1	Gammaproteobacteria no cultivada (HG325796)	Depósito rojo en túnel de granito	93	<i>Acidiferrobacter thiooxydans</i> (AF387301)	85
Gemmatimonadetes						
13DK-A11	1	Bacteria no cultivada (JQ427578)	Suelo alcalino	95	<i>Gemmatimonas phototrophica</i> (AUXF01000006)	83
13DK-B12	1	Bacteria no cultivada (EU134825)	Suelo de pradera	97	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	82
13DK-H9	1	Bacteria no cultivada (JN607020)	Biofilm en tubo de lava	94	<i>Thiohalomonas denitrificans</i> (EF117909)	89
Nitrospirae						
13DK-B1	1	<i>Nitrospira</i> sp. no cultivado (JN802217)	Biofilm en electrodo	94	<i>Nitrospira moscoviensis</i> (X82558)	94
Planctomycetes						
13DK-G12	1	<i>Pirellula</i> sp. no cultivado (HE861147)	Suelo de rizosfera	97	<i>Pirellula staleyii</i> (CP001848)	89
Bacterias sin clasificar*						
13DK-E3	1	Bacteria no cultivada (EU680429)	Suelo	90	-	-
13DK-E10	1	Bacteria no cultivada (HM444914)	Biofilm en tubo de lava	84	-	-
13DK-F5	1	Bacteria no cultivada (JQ678402)	Sistema hidrotermal	95	-	-
13DK-G3	1	Bacteria no cultivada (EU132163)	Suelo de pradera	89	-	-
13DK-G6	1	Bacteria no cultivada (HM187283)	Sedimento subterráneo	87	-	-
13DK-G9	1	Bacteria no cultivada (FJ004668)	Suelo	89	-	-
13DK-H1	1	Bacteria no cultivada (HM186396)	Sedimento subterráneo	92	-	-
13DK-H3	1	Bacteria no cultivada (HM444914)	Biofilm en tubo de lava	88	-	-
13DK-H11	1	Bacteria no cultivada (JF420678)	Sedimento glacial	93	-	-

*No fue posible clasificar los OTUs con un porcentaje de similitud menor del 80% (EZtaxon), por lo que no se especifica la especie cultivada más cercana.

Tabla 3.11 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias metabólicamente activas obtenidas de la muestra 0313T2A (92 secuencias, 56 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Alphaproteobacteria						
13RK135	4	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (FJ025099)	Nódulo	99	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> (EU561065)	99
13RK27	4	<i>Sphingomonas</i> sp. (HF954436)	Suelo	99	<i>Sphingomonas echinoides</i> (JH584237)	100
13RK110	3	Bacteria no cultivada (JX680715)	Muestra ambiental	99	<i>Caulobacter mirabilis</i> (AJ227774)	96
13RK116	3	<i>Methylobacterium</i> sp. (AB673242)	Semilla de perilla	99	<i>Methylobacterium oryzae</i> (AY683045)	99
13RK122	2	Bacteria no cultivada (FM874375)	Polvo de colchón	98	<i>Roseomonas aquatica</i> (AM231587)	99
13RK113	2	Alphaproteobacteria M2J2 (DQ234495)	Cieno de estanque	99	<i>Sphingomonas mucosissima</i> (AM229669)	99
13RK39	1	Bacteria no cultivada (JQ906081)	Agua desinfectada	99	<i>Phreatobacter oligotrophus</i> (HE616165)	94
13RK98	1	Bacteria no cultivada (JN052630)	Rizosfera de cítricos	99	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (AJ227780)	100
13RK106	1	Bacteria no cultivada (JF236059)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	99	<i>Sphingomonas kaistensis</i> (AY769083)	99
13RK114	1	<i>Methylobacterium lusitanum</i> (EF015479)	Agua de mar	99	<i>Methylobacterium rhodesianum</i> (AB175642)	100
13RK75	1	Bacteria WM06i_B6A (HM989890)	Filosfera	99	<i>Aureimonas altamirensis</i> (DQ372921)	97
13RK139	1	Bacteria no cultivada (GQ402822)	Turba de pantano	98	<i>Caulobacter mirabilis</i> (AJ227774)	96
13RK140	1	<i>Bradyrhizobium</i> sp. no cultivado (GQ129893)	Nave espacial	99	<i>Afipia massiliensis</i> (AY029562)	98
13RK125	1	Bacteria no cultivada (JX967599)	Suelo	99	<i>Methylocapsa aurea</i> (FN433469)	97
13RK119	1	Bacteria no cultivada (EF530680)	Biofilm microbiano	99	<i>Amphiplicatus metriotheophilus</i> (KF153051)	93
13RK96	1	Bacteria no cultivada (HM811126)	Herida	99	<i>Rubellimicrobium mesophilum</i> (KK088571)	97
13RK67	1	<i>Acetobacteraceae</i> bacteria (JX067726)	Néctar floral	99	<i>Roseomonas ludipueritiae</i> (AJ488504)	97
13RK89	1	<i>Sphingomonas</i> sp. (FR696369)	Filosfera	99	<i>Sphingomonas endophytica</i> (HM629444)	97
13RK63	1	Bacteria no cultivada (HM921109)	Agua subterránea	99	<i>Hyphomicrobium facile</i> (Y14311)	96
Betaproteobacteria						
13RK70	8	<i>Methylibium</i> sp. (EU130970)	Filtro de carbón	99	<i>Methylibium petroleiphilum</i> (CP000555)	99
13RK81	2	Burkholderiales no cultivado (JQ254437)	Tejidos de hormiga	99	<i>Aquabacterium commune</i> (AF035054)	98

Capítulo 3

13RK97	1	<i>Undibacterium oligocarboniphilum</i> (NR_117348)	Sistema de agua purificada	99	<i>Undibacterium oligocarboniphilum</i> (GQ379228)	100
13RK57	1	Bacteria no cultivada (EU133837)	Suelo de pradera	96	<i>Zoogloea resiniphila</i> (AJ011506)	92
13RK123	1	<i>Cupriavidus necator</i> (AB167205)	Cultivo quimiostático	99	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	99
13RK131	1	Bacteria no cultivada (EU881106)	Suelo forestal	99	<i>Cupriavidus gilardii</i> (EU024163)	91
13RK101	1	Betaproteobacteria no cultivada (HE604299)	Biofilm negro de ferromanganeso	99	<i>Azoarcus indigens</i> (AF011345)	89
13RK128	1	<i>Burkholderia</i> sp. (JN872505)	Néctar floral	99	<i>Burkholderia caledonica</i> (BAYE01000050)	98
13RK58	1	<i>Ralstonia</i> sp. no cultivada (AM159296)	Rizosfera de arroz	95	<i>Rugamonas rubra</i> (HM038005)	94
13RK87	1	Betaproteobacteria no cultivada (HE604299)	Biofilm negro de ferromanganeso	99	<i>Thiobacter subterraneus</i> (AB180657)	90
Gammaproteobacteria						
13RK80	3	<i>Pseudomonas</i> sp. (KC195904)	Suelo agrícola	100	<i>Pseudomonas koreensis</i> (AF468452)	100
13RK10	3	<i>Xanthomonadaceae</i> no cultivada (AM936440)	Suelo contaminado con hidrocarburos	98	<i>Panacagrimonas perspica</i> (AB257720)	98
13RK117	2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (EU927145)	Muestra de suelo	98	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> (AB021405)	99
13RK132	1	<i>Moraxella osloensis</i> (AB643595)	Ropa maloliente	99	<i>Moraxella osloensis</i> (EU499677)	99
13RK65	1	<i>Moraxella</i> sp. (HE575924)	Fluido de metalurgia	87	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> (AB021405)	99
13RK59	1	Bacteria no cultivada (KC605429)	Agua subterránea	99	<i>Nevskia terrae</i> (GQ845011)	89
13RK1	1	Bacteria no cultivada (HM308524)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	99	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (APON01000005)	99
13RK19	1	Bacteria no cultivada (JF500188)	Sedimento terrestre	99	<i>Perlucidibaca piscinae</i> (DQ664237)	93
Actinobacteria						
13RK107	2	Actinomycetales no cultivado (EU434898)	Refugio natural	99	<i>Pseudonocardia alaniniphila</i> (EU722519)	94
13RK2	2	<i>Micrococcus</i> sp. no cultivado (KF717082)	Rizosfera	99	<i>Micrococcus luteus</i> (CP001628)	100
13RK94	2	Bacteria no cultivada (GQ263011)	Depósito de residuos nucleares	95	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	92
13RK137	1	Actinobacteria no cultivada (EF188316)	Cueva de Altamira	99	<i>Propionibacterium acnes</i> (AWZZ01000008)	100
13RK22	1	Bacteria no cultivada (JF208970)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	95	<i>Propionibacterium acnes</i> (AWZZ01000008)	95
13RK133	1	Actinobacteria no cultivada (EF220491)	Suelo sin vegetación	98	<i>Ilumatobacter fluminis</i> (AB360343)	99
13RK103	1	<i>Microbacterium ginsengisoli</i>	Suelo	97	<i>Microbacterium ginsengisoli</i> (AB271048)	98

		(FN668008)				
13RK68	1	Bacteria no cultivada (HM186518)	Subsuelo saturado	96	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	94
Firmicutes						
13RK21	3	Bacteria no cultivada (KC432448)	Humedal	99	<i>Gracilibacter thermotolerans</i> (DQ117465)	83
13RK105	1	Bacteria no cultivada (EU335160)	Suelo saturado	98	<i>Thermolithobacter ferrireducens</i> (AF282253)	82
13RK40	1	<i>Brochothrix thermosphacta</i> (JF756247)	Carne de vacuno	99	<i>Brochothrix thermosphacta</i> (AODI01000055)	100
13RK93	1	Bacteria no cultivada (JF266525)	Biofilm, tubo de lava	97	<i>Desulfotomaculum thermocisternum</i> (U33455)	81
Armatimonadetes						
13RK124	6	<i>Fimbriimonas ginsengisoli</i> (CP007139)	Campo de ginseng	91	<i>Fimbriimonas ginsengisoli</i> (GQ339893)	90
Acidobacteria						
13RK73	2	Acidobacteria no cultivada (HQ729820)	Suelo de pradera	99	<i>Holophaga foetida</i> (AGSB01000040)	83
13RK109	1	Acidobacteria no cultivada (AM935084)	Suelo contaminado con hidrocarburos	98	<i>Thermoanaerobaculum aquaticum</i> (JMFG01000020)	82
Deltaproteobacteria						
13RK145	1	Bacteria no cultivada (HE602920)	Biofilm de una cueva	98	<i>Geobacter sulfurreducens</i> (AE017180)	82
Chloroflexi						
13RK126	1	Bacteria no cultivada (EU134206)	Suelo de pradera	97	<i>Litorilinea aerophila</i> (JQ733906)	82
Nitrospirae						
13RK9	1	Nitrospirae no cultivado (HE603172)	Biofilm de una cueva	98	<i>Nitrospira moscoviensis</i> (X82558)	98
Bacterias sin clasificar*						
13RK111	1	Bacteria no cultivada (EU135050)	Suelo de pradera	93	-	-

*No fue posible clasificar los OTUs con un porcentaje de similitud menor del 80% (EZtaxon), por lo que no se especifica la especie cultivada más cercana.

En el análisis matemático de la distribución de las secuencias de los clones, ninguna de las curvas de rarefacción obtenidas a nivel de especie, 97% de similitud, y de género, 95% de similitud, llegaron a alcanzar la asíntota, a excepción del ARN de la muestra 0313T2A, en la que estas dos funciones ya tendían a la estabilidad (Figura 3.11 A y B). Las obtenidas a nivel de filo, 80% de similitud, alcanzaron la fase estacionaria en la muestra 0212T2A (Figura 3.11 A), mientras que en la muestra 0313T2A solamente lo hizo en su totalidad la de la comunidad metabólicamente activa, aunque la de la comunidad total ya mostraba aproximación a la saturación (Figura 3.11 B).

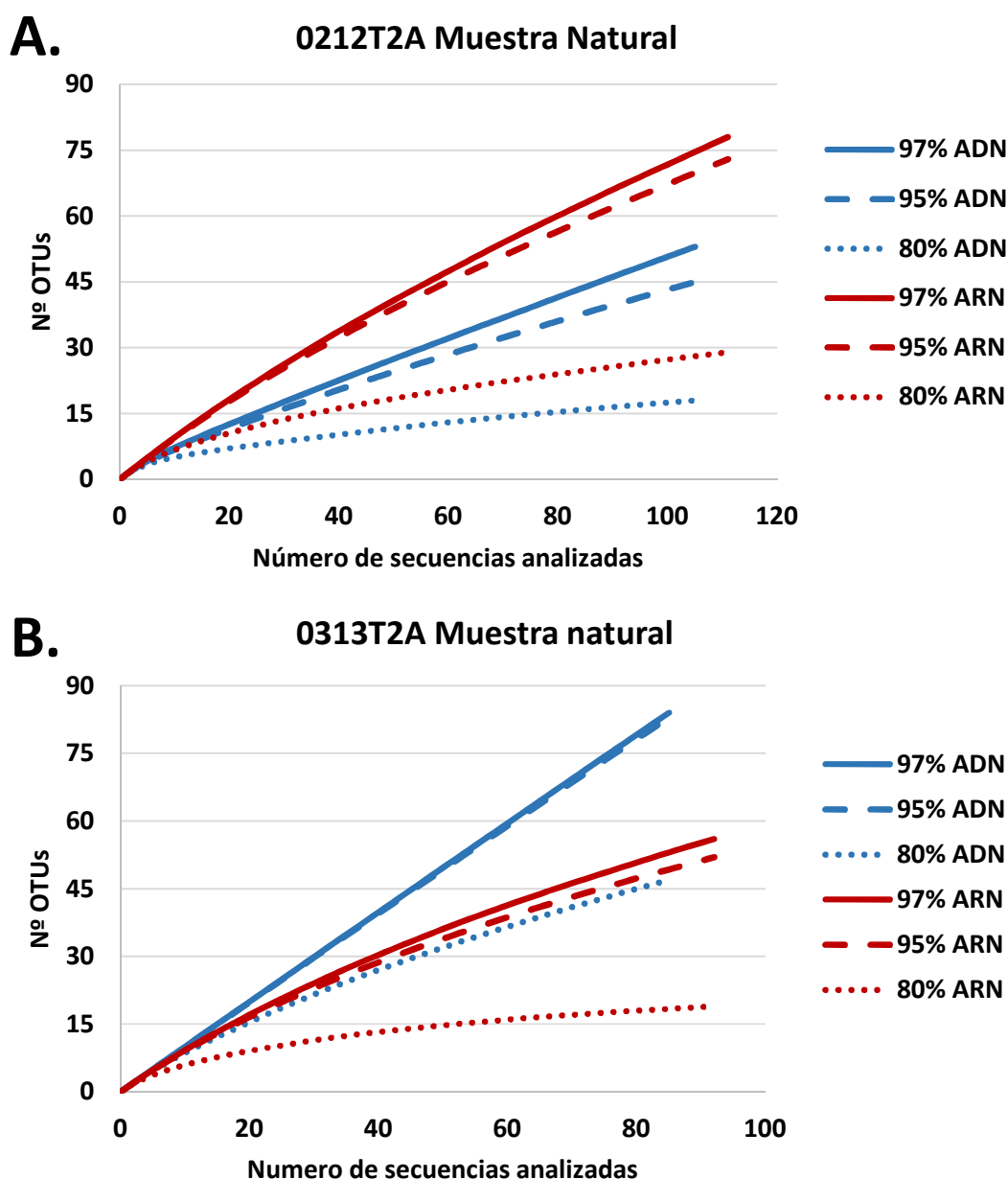


Figura 3.11 Curvas de rarefacción. A. Muestra natural 0212T2A. B. Muestra natural 0313T2A. Se representa el número de secuencias analizadas frente al número de OTUs generados a tres niveles de similitud: especie (97%), género (95%) y filo (80%). Genoteca de ADN (—). Genoteca de ARN (—).

Estos resultados demostraron que las muestras presentaban una amplia diversidad de comunidades bacterianas.

Por último, hay que señalar que también se realizó la amplificación de las muestras de depósitos negros utilizando cebadores específicos de arqueas, hongos y otros eucariotas con resultados negativos.

➤ **Reactivo Leucoberbelin blue-I**

Al poner en contacto las diferentes diluciones realizadas del reactivo con la birnesita sintética obtenida en el laboratorio, se produjo inmediatamente un cambio de color a azul intenso, resultando positiva esta reacción (Figura 3.12 A y B).

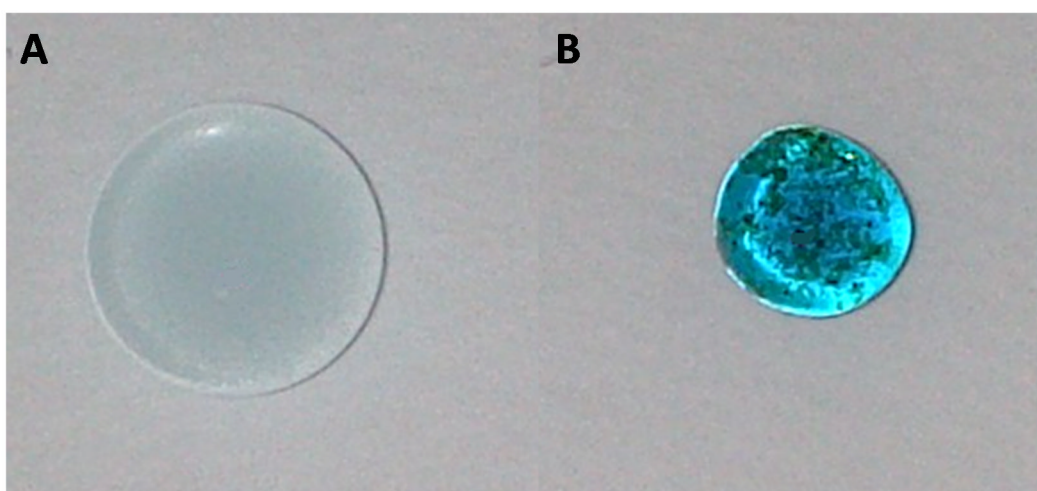


Figura 3.12 Reacción del reactivo Leucoberbelin blue-I en contacto con la birnesita sintetizada en el laboratorio. A. Gota de la dilución del reactivo 1:2,5 mostrando aspecto azul muy leve. B. Gota de la dilución del reactivo 1:2,5 en contacto con la birnesita, mostrando un color azul muy intenso.

En la segunda parte del experimento, se puso en contacto el reactivo con una placa sembrada con el contenido del cultivo de enriquecimiento en medio Rouf modificado de la muestra 0212T2A (Figura 3.13 A) y con la muestra natural 0313T2A (Figura 3.13 B). Tanto para la muestra natural como para el contenido del cultivo de enriquecimiento, se produjo un cambio de color en el reactivo Leucoberbelin blue-I a azul intenso (Figura 3.13 A y B).

Una vez que el reactivo fue aplicado a la totalidad de las placas, se rasparon y, tanto de ésta como de la muestra natural tratada en las mismas condiciones, se extrajo el ADN (Figura 3.13 B). Dicho ADN fue posteriormente sometido al estudio de las comunidades bacterianas por DGGE y también mediante PCR con cebadores específicos para arqueas, hongos y otros eucariotas, aunque en ningún caso se amplificaron estos microorganismos. Parte del ADN extraído también se derivó a la búsqueda del gen *mofA*.

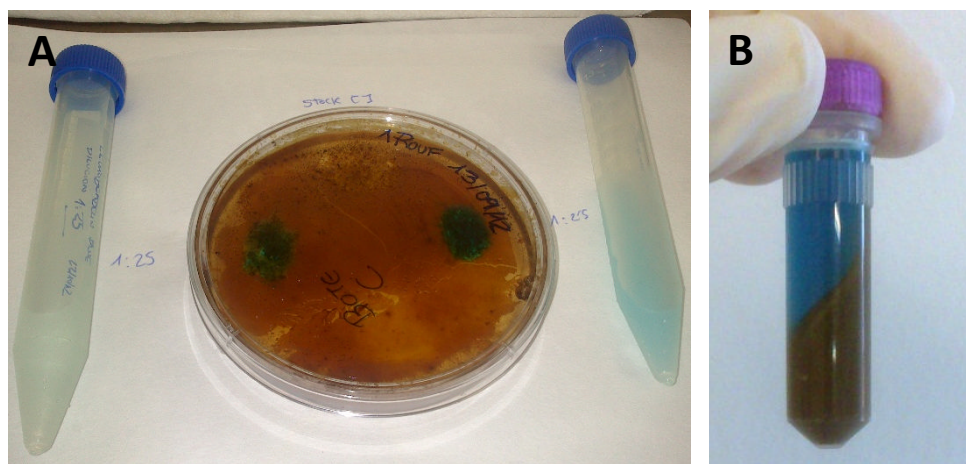


Figura 3.13 Reacciones del reactivo Leucoberbelin blue-I con las muestras de depósitos negros de Oporto. A. Placa sembrada con contenido del cultivo de enriquecimiento de la muestra 0212T2A, mostrando dos manchas azules en las zonas en las que el reactivo ha entrado en contacto con los óxidos de manganeso. B. Muestra natural 0313T2A puesta en contacto con el reactivo y sometida al proceso de extracción de ADN.

➤ Estudio de las comunidades bacterianas mediante DGGE

Se realizó un análisis comparativo entre las muestras naturales 0212T2A y 0313T2A, los cultivos de enriquecimiento de dichas muestras, las cepas aisladas y los clones, mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE), incluyendo además a la cepa *Leptothrix cholodnii* LMG 8142 y el ADN extraído de los diversos tratamientos con el compuesto Leucoberbelin blue-I.

Los patrones de bandas que se obtuvieron revelaron diferencias entre las muestras estudiadas, en cuanto a la abundancia y distribución de las bandas mayoritarias.

Inicialmente, se realizó una DGGE para comparar las comunidades bacterianas de las muestras del cultivo de enriquecimiento en medio Rouf modificado de color negro de la muestra 0212T2A, extraídos mediante tres metodologías diferentes, Fast DNA Spin® Kit for soil, Geniul y Griffiths y col. (2000). El objetivo fue valorar si había algún método que presentara ventajas en la extracción de los ácidos nucleicos y observar las diferencias entre la comunidad total de bacterias y la comunidad metabólicamente activa de esta muestra, pudiendo además comparar con cepas aisladas y realizando una identificación tentativa de ciertas bandas. Los resultados de esta primera DGGE se muestran en la Figura 3.14.

En este caso, los patrones de bandas que se obtuvieron presentaron el mismo número de bandas mayoritarias, con idéntica distribución, por lo que se pudo deducir en este caso que la comunidad total de bacterias y la metabólicamente activa eran muy similares, hecho que quedó constatado en los datos de las genotecas

construidas (Tablas 3.3 y 3.4). Además, se detectaron las bandas correspondientes a cuatro géneros bacterianos que habían podido ser también aislados en los cultivos sólidos: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Ensifer* y *Arthrobacter* (Figura 3.14). Al no existir diferencias notables entre los métodos de extracción de ARN, se decidió continuar empleando únicamente el método de Griffiths y col. (2000) para el resto de las muestras estudiadas en esta tesis que requirieran también el estudio de la comunidad bacteriana metabólicamente activa.

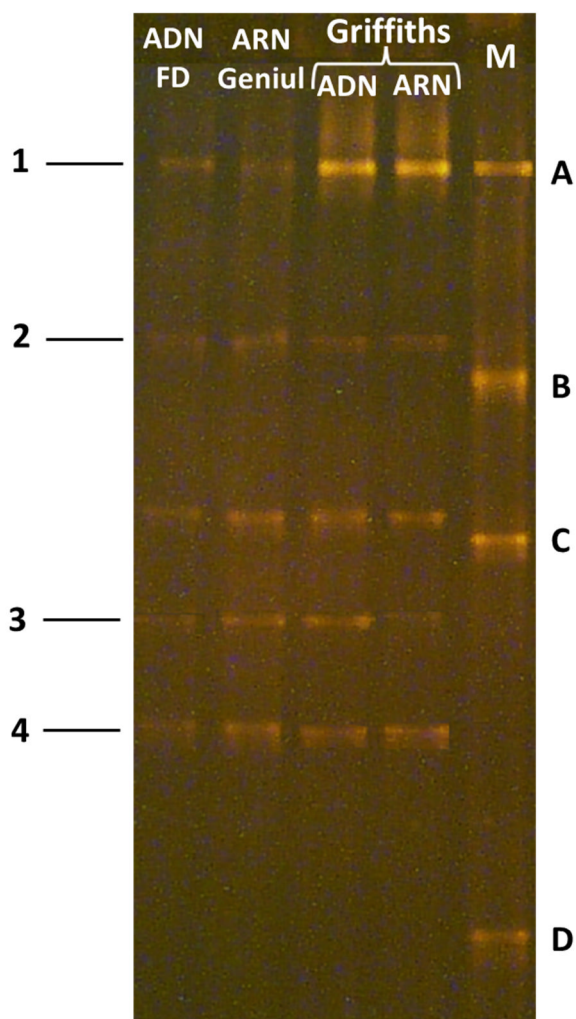


Figura 3.14 Análisis de las comunidades bacterianas de los cultivos de enriquecimiento de color negro en medio Rouf modificado de la muestra 0212T2A mediante DGGE con gradiente de desnaturalización 30-55%. Perfil M: marcador de electroforesis compuesto por *Pseudomonas* sp. (A), *Escherichia coli* (B), *Paenibacillus* sp. (C) y *Streptomyces* sp. (D). Perfil ADN FD: bacterias totales extraídas mediante el método FastDNA Spin® Kit for soil. Perfil ARN Geniul: bacterias metabólicamente activas obtenidas con el método Geniul. Perfiles Griffiths ADN y ARN: Bacterias totales y metabólicamente activas obtenidas aplicando el método Griffiths y col. (2000), respectivamente. Identificación tentativa de las bandas: 1: *Pseudomonas* sp., 2: *Bacillus* sp., 3: *Ensifer* sp., 4: *Arthrobacter* sp.

En la siguiente DGGE, se llevó a cabo una comparación entre las comunidades presentes en la muestra 0212T2A respecto a las de 0313T2A, como se puede observar en la Figura 3.15. También se analizó el ADN extraído de los diversos tratamientos con el compuesto Leucoberbelin blue-I, para comprobar si afectaba en algo a la comunidad microbiana y era capaz de liberar más microorganismos cuando se aplicaba a las muestras, al disolver los óxidos de manganeso, y la cepa *Leptothrix cholodnii* LMG 8142. El ARN de los cultivos de enriquecimiento de las muestras 0212T2A y 0313T2A no se incluyó porque en ambos casos se comprobó que presentaba el mismo patrón de bandas que el ADN.

A pesar de ser muestras de la misma naturaleza, 0212T2A y 0313T2A mostraron una distinta distribución de las comunidades bacterianas, quizás debido en parte a que inicialmente la muestra de 2013 no se sonicó y la de 2012 sí. Se observó que el cultivo de enriquecimiento de 0212T2A contenía bandas que no aparecían en la muestra natural original, indicando que se consiguió poner de manifiesto microorganismos inicialmente minoritarios. Las sucesivas resiembras de los cultivos de enriquecimiento provocaron que algunas de las bandas desaparecieran, a la vez que otras surgieron, lo que podría estar generado por el propio favorecimiento del crecimiento de ciertas bacterias, sumado a la desaparición de otras que no encuentran buenas condiciones para el desarrollo a medida que pasa el tiempo.

El compuesto Leucoberbelin blue-I desveló nuevas bandas al ser aplicado en el cultivo de enriquecimiento de la muestra 0212T2A, pero no afectó de manera concluyente a la comunidad bacteriana de la muestra 0313T2A.

La comunidad total y la metabólicamente activa de la muestra 0313T2A presentaron un patrón de bandas diferente, con algunas de ellas coincidentes, hecho que también se comprobó en las dos genotecas elaboradas, al existir una distinta distribución de especies pero repitiéndose algunas en ambas comunidades (Tablas 3.10 y 3.11).

Por otra parte, el cultivo de enriquecimiento negro de la muestra 0313T2A mostró menor número de bandas que el marrón, indicando una menor cantidad de comunidades bacterianas presentes. Finalmente, el cultivo de enriquecimiento marrón fue el que más bandas presentó de todos, hecho que sugirió que era el que poseía mayor diversidad bacteriana, como también quedó patente en las genotecas (Tablas 3.5, 3.6 y 3.7).

Leptothrix cholodnii LMG 8142 mostró más de una banda, lo que dificultó su comparación con el resto de las muestras, a pesar de que algunas estuvieron a la misma altura que las de los demás patrones obtenidos.

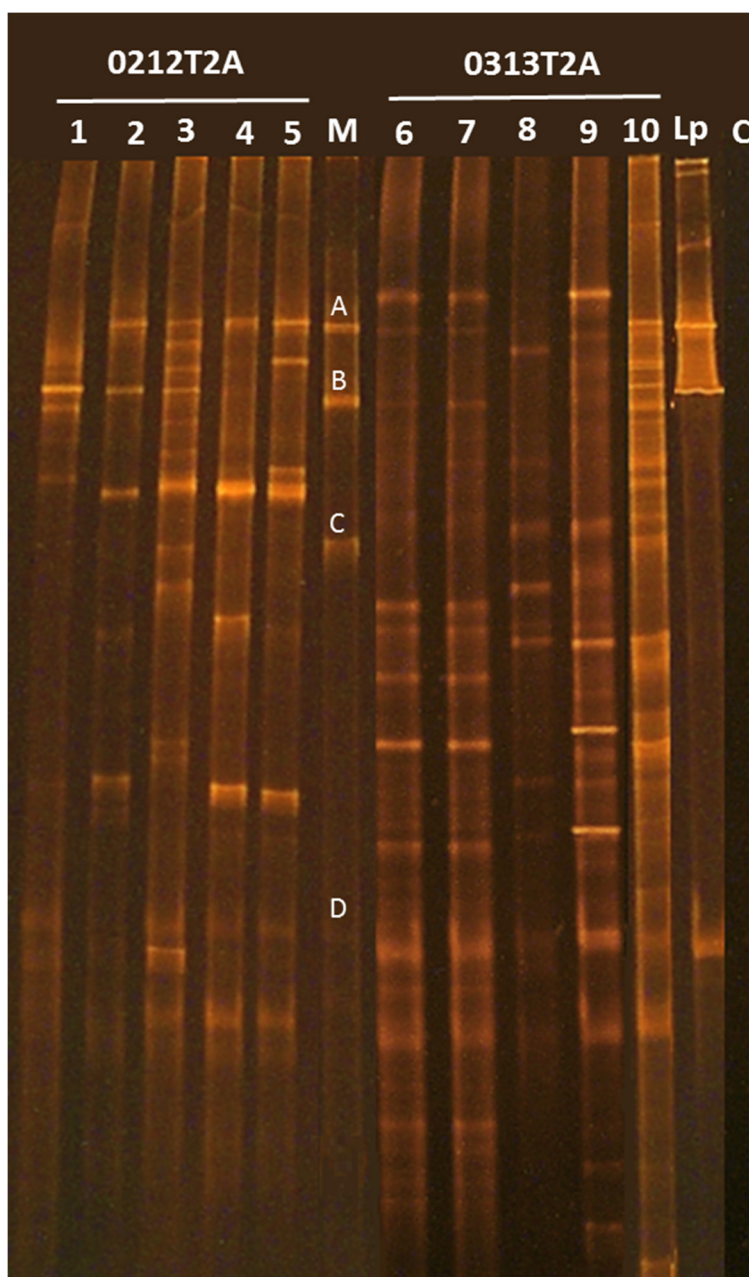


Figura 3.15 Análisis y comparación de las comunidades bacterianas de las muestras 0212T2A y 0313T2A mediante DGGE con gradiente de desnaturalización 30-55%. Perfil M: marcador de electroforesis compuesto por *Pseudomonas* sp. (A), *Escherichia coli* (B), *Paenibacillus* sp. (C) y *Streptomyces* sp. (D). Perfiles de la muestra 0212T2A: 1 - ADN de la muestra natural. 2 - ADN del cultivo de enriquecimiento negro en medio Rouf modificado. 3 - ADN del mismo cultivo de enriquecimiento tratado con el compuesto Leucoberbelin-blue I. 4 - ADN de la segunda resiembra del mismo cultivo de enriquecimiento. 5 - ADN de la tercera resiembra del mismo cultivo de enriquecimiento. Perfiles de la muestra 0313T2A: 6 - ADN de la muestra natural. 7 - ADN de la muestra natural tratada con el compuesto Leucoberbelin blue-I. 8 - ADN del cultivo de enriquecimiento negro en medio Rouf modificado. 9 - ADN del cultivo de enriquecimiento marrón en medio Rouf modificado. 10 - ARN de la muestra natural. Perfil Lp: Cepa *Leptothrix cholodnii* LMG 8142. Perfil C: Control negativo del compuesto Leucoberbelin blue-I.

➤ **Estudio del gen *mofA***

En la PCR efectuada con la pareja de cebadores no degenerados MAU/MAL, sólo se obtuvieron bandas muy leves a 700 pb en el caso de la muestra 0212T2A diluida, 0212T2A de cultivo de enriquecimiento negro y de tres clones de esta muestra identificados como *Pseudomonas* spp.: 12DNK82, 12DNK1 y 12DNK88. Debido a que las bandas eran poco apreciables, se llevó a cabo una PCR con los cebadores degenerados MDF/MDR, y se obtuvieron bandas más intensas en la región de 250-200 pb en todas las muestras reamplificadas que habían mostrado una pequeña señal en la PCR con los cebadores no degenerados: los tres clones, 0212T2A dilución de la muestra natural, 0212T2A cultivo de enriquecimiento, además de la cepa *Pseudomonas putida* aislada del cultivo de enriquecimiento (Figura 3.16). Los tres clones muestran la banda a 700 pb reamplificada, además de la nueva banda alrededor de los 250 pb esperada con la segunda PCR.

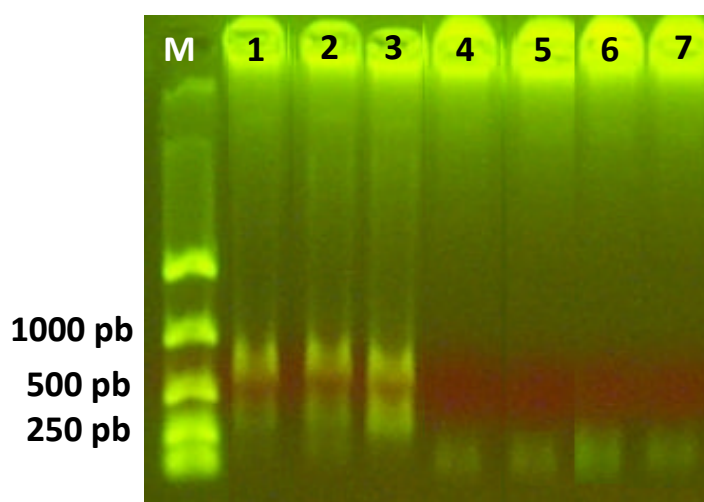


Figura 3.16 Bandas positivas obtenidas en la PCR con los cebadores degenerados MAU/MAL. M: Marcador Easy Ladder I. 1: Clon 12DNK82 reamplificado. 2: Clon 12DNK1 reamplificado. 3: Clon 12DNK88 reamplificado. 4: Muestra natural 0212T2A reamplificada. 5: Cultivo de enriquecimiento negro de la muestra 0212T2A. 6: Cultivo de enriquecimiento negro de la muestra 0212T2A reamplificado. 7: Cepa reamplificada de *Pseudomonas putida* aislada del cultivo de enriquecimiento negro de la muestra 0212T2A.

Para comprobar que estas reacciones se llevaron a cabo correctamente, se procedió a realizar dos PCR con los cebadores no degenerados y degenerados, respectivamente, con la cepa de la colección belga *Leptothrix cholodnii* LMG 8142. La PCR con los cebadores no degenerados resultó negativa, tal y como era esperable (Siering y Ghiorse, 1997). Empleando los cebadores degenerados MDF/MDR, desarrollados inicialmente para las especies de *Leptothrix* que no mostraban amplificación con los cebadores MAU/MAL, se pudo obtener banda a 200 pb en todas las cantidades y diluciones que se probaron (Figura 3.17), indicando que la cepa *Leptothrix cholodnii* LMG 8142 es efectivamente poseedora del gen *mofA*.

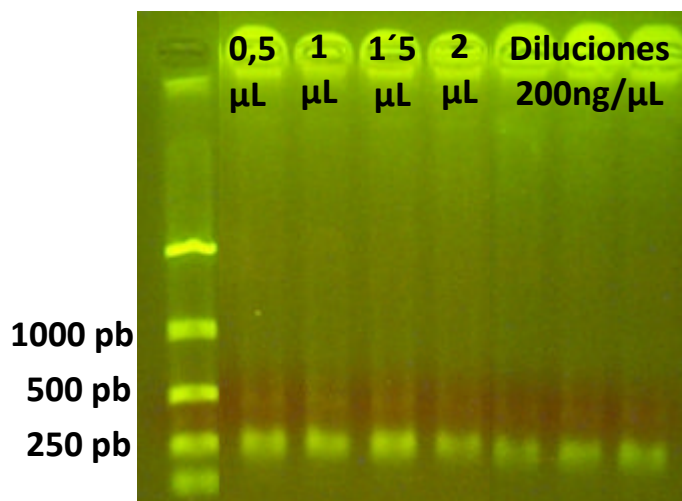


Figura 3.17 PCR con los cebadores degenerados MDF/MDR de la cepa *Leptothrix cholodnii* LMG 8142, manifestando la banda a 200 pb y demostrando la posesión del gen *mofA* por parte de esta bacteria.

De todas las cepas analizadas en busca del gen *mofA* (*Bacillus* spp., *Azotobacter* spp., *Ensifer* spp., *Pseudomonas* spp. y *Micromonospora aurantiaca*), únicamente se obtuvieron resultados positivos con la cepa *Pseudomonas putida*. Tampoco se obtuvieron bandas de la muestra natural 0313T2A, ni de sus cultivos de enriquecimiento, ni de las muestras tratadas con el reactivo Leucoberbelin blue-I.

➤ Caracterización mineralógica y morfológica

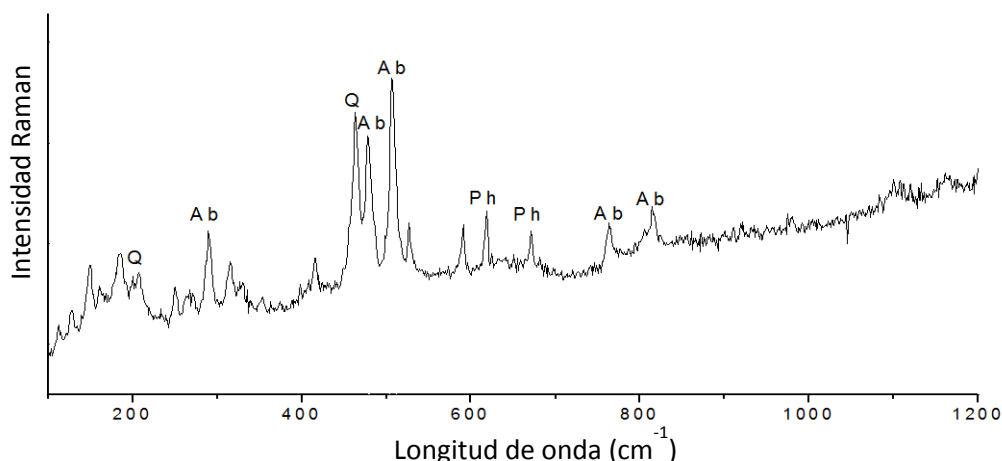


Figura 3.18 Espectro Micro-Raman de los depósitos negros de ferromanganeso del túnel de Paranhos, mostrando albita (Ab), cuarzo (Q) y un compuesto con base de porfirina (Ph).

Los análisis Micro-Raman de los depósitos negros de ferromanganeso del túnel de Paranhos (Figura 3.18) revelaron la presencia de albita (de tipo plagioclasa), con bandas características a 815, 764, 506, 478 y 289 cm^{-1} . La albita se identificó en asociación con cuarzo, con bandas características a 464, 206 y 128 cm^{-1} .

Estos dos minerales derivan de la roca madre granítica. Además, también fue posible localizar un compuesto orgánico, cuyas características espectrales apuntaban a un compuesto porfirínico, con bandas a los 1535 (no se muestra en la Figura 3.18), 746 y 680 cm^{-1} .

Por otra parte, las observaciones al microscopio electrónico de barrido (SEM) y de transmisión (TEM) se llevaron a cabo con el objetivo de caracterizar morfológicamente los microorganismos presentes en las muestras y determinar la presencia de hierro y manganeso.

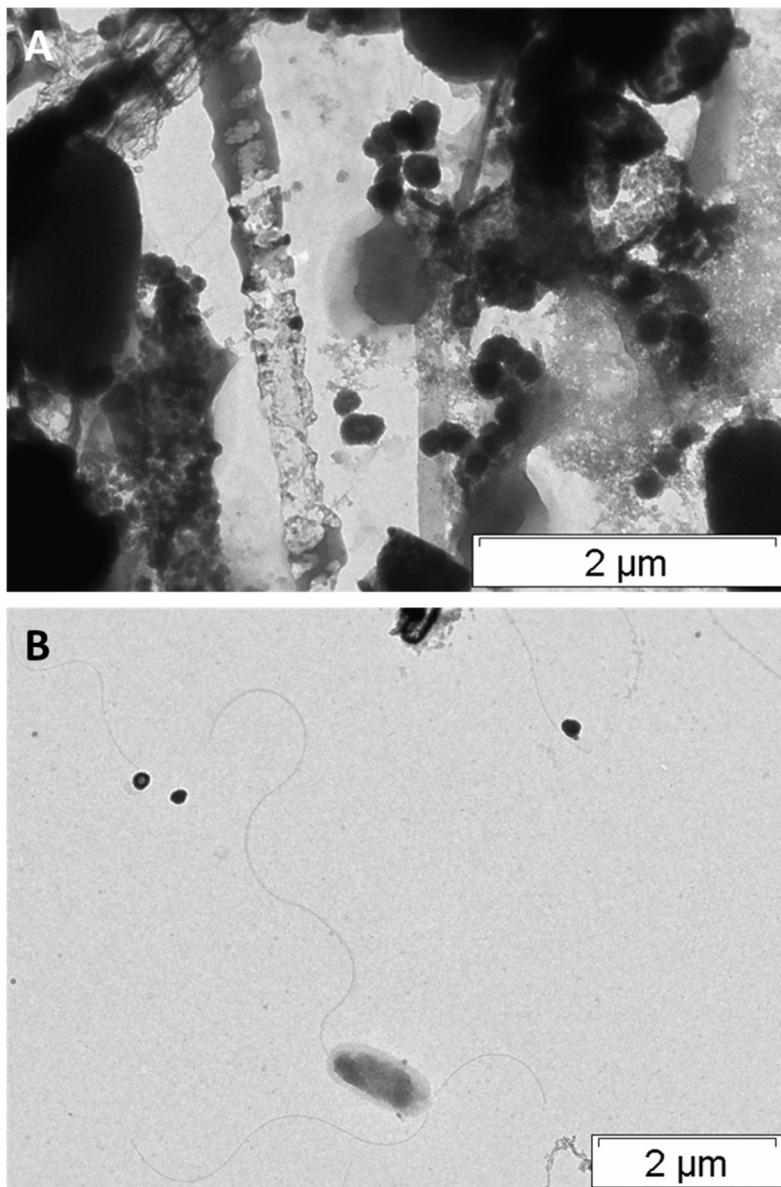


Figura 3.19 Fotografías TEM de los cultivos de enriquecimiento de la muestra 0212T2A. A. Filamento junto a agregados minerales ricos en óxidos de manganeso. B. Bacteria flagelada.

El TEM permitió observar muchos agregados minerales ricos en Mn (Figura 3.19 A). Además, mediante esta técnica se pudieron encontrar, en las muestras

de depósitos negros, filamentos bacterianos (Figura 3.19 A) y bacilos con flagelos (Figura 3.19 B).

Se comprobó que en algunos casos, los filamentos estaban asociados con una gran cantidad de flagelos (Figura 3.20 A), en principio de las células bacilares observadas (Figura 3.19 B).

Mediante TEM-EDS se observó que los depósitos oscuros sobre los filamentos presentaron una composición química rica en Mn y Fe (Figura 3.20 B) y la vaina de dichos filamentos poseyó una estructura rica en carbono (Figura 3.20 C).

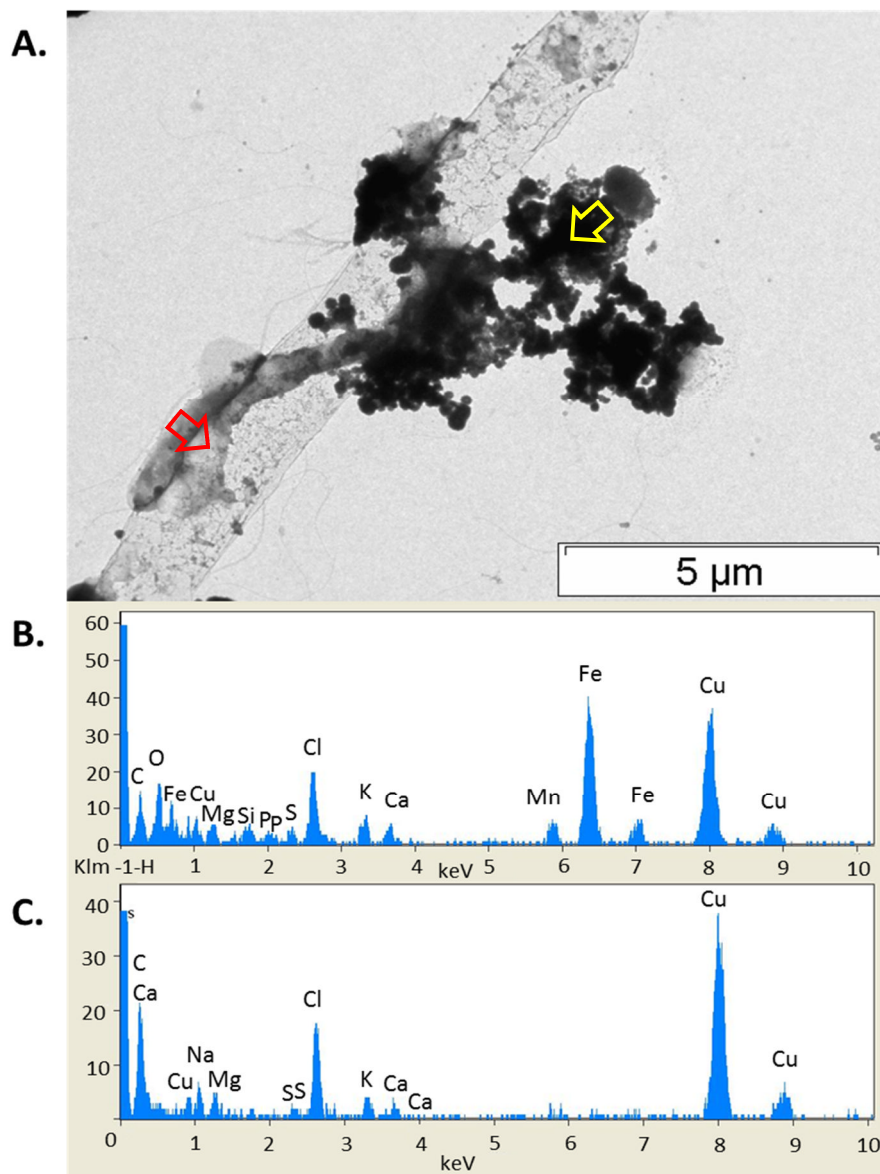


Figura 3.20 Análisis mediante TEM-EDS de un filamento reticulado en el cultivo de enriquecimiento 0212T2A. A. Fotografía del filamento con agregados minerales. B. Espectro EDS de los agregados minerales negros (flecha amarilla). C. Espectro EDS de la zona transparente del filamento (flecha roja).

Mediante FESEM, se observaron precipitados ricos en manganeso y hierro asociados a EPS, excretados por microorganismos filamentosos y esféricos (Figura 3.21).

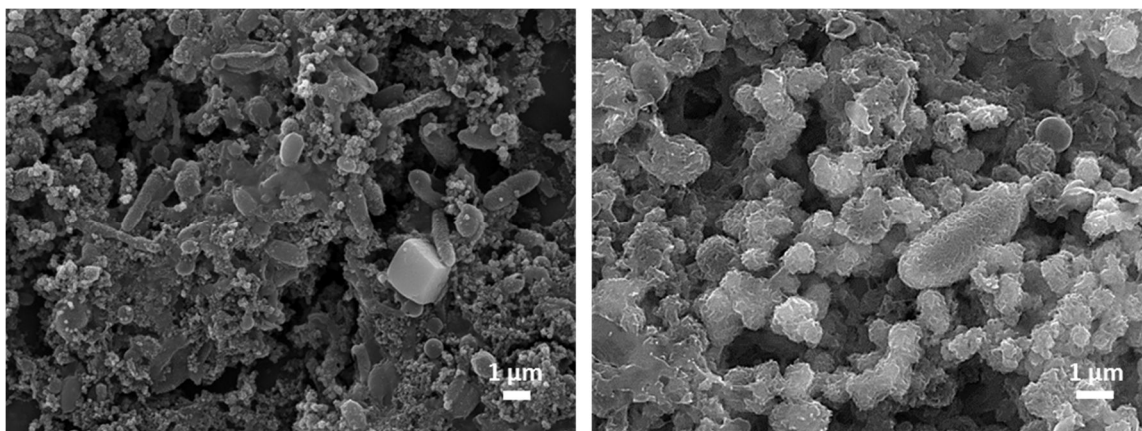


Figura 3.21 Imágenes de FESEM de los cultivos de enriquecimiento de las muestras de depósitos negros de ferromanganeso de la mina de agua de Paranhos con agregados ricos en óxidos de Mn y Fe recubriendo las células bacterianas y alrededor de ellas, embebidos en sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

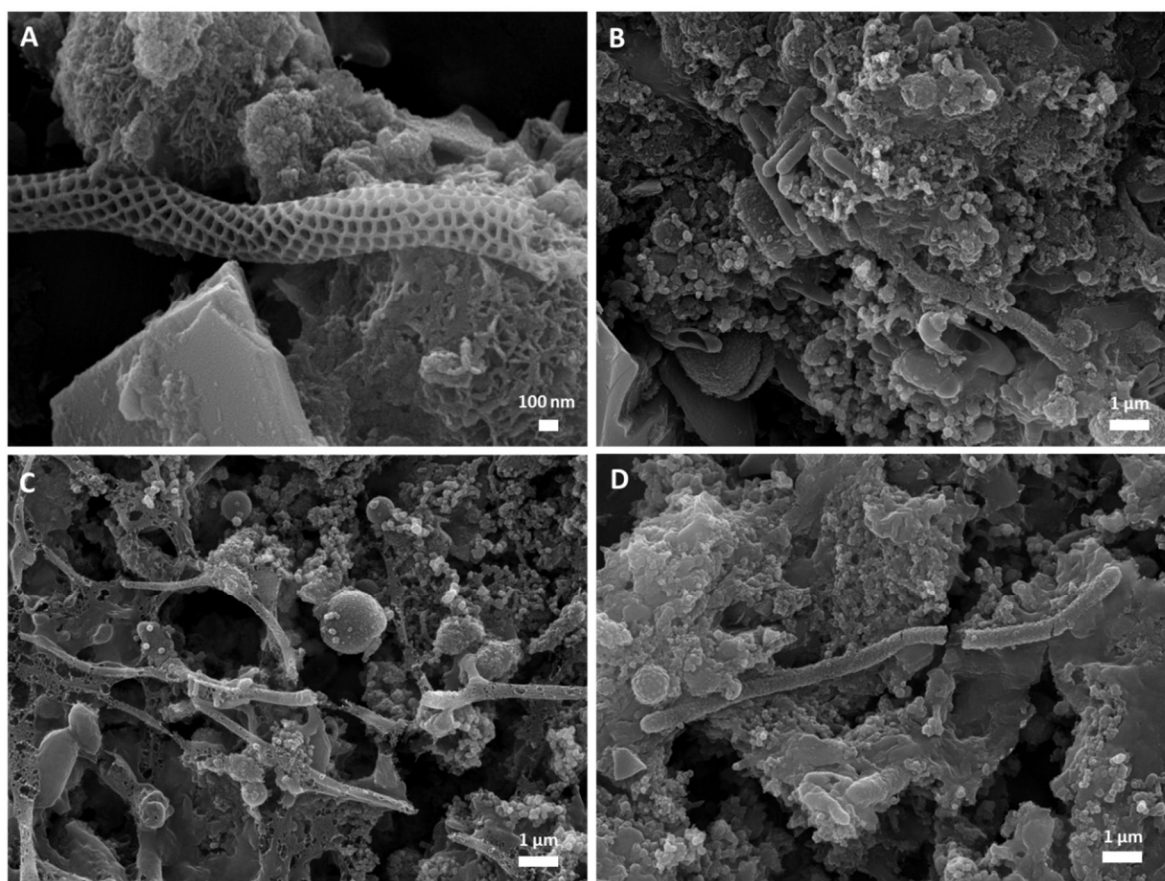


Figura 3.22 Imágenes FESEM de la muestra 0212T2A. A. Filamento reticulado. B. Filamento liso mineralizado junto a células bacilares y cocoides. C. Filamentos lisos con estructura reticulada vestigial y partículas minerales embebidas en EPS. D. Filamento liso mineralizado embebido en EPS junto a una espora de ornamentación equinulada.

Se detectaron también los enigmáticos filamentos reticulados (Figura 3.22 A) y otra clase de filamentos lisos que, aunque poseían vainas mineralizadas, no mostraban la ornamentación característica de los filamentos reticulados (Figura 3.22 B, C y D).

Además de los filamentos, también se observaron bacilos y cocos mineralizados y mucho óxido de manganeso en las estructuras (Figura 3.22 B, C y D). En ocasiones, se detectaron unos filamentos con estructura reticulada vestigial (parecida a una tela de encaje), pero estaban vacíos y embebidos en redes formadas por las EPS (Figura 3.22 C).

Es preciso resaltar que en las resiembras de los cultivos de enriquecimiento, analizadas tanto con TEM como con FESEM, los filamentos reticulados fueron desapareciendo, siendo posible únicamente observar filamentos lisos mineralizados sin la vaina característica, como los de la Figura 3.22 B, C y D.

La cepa de *Leptothrix cholodnii* LMG 8142 también fue analizada mediante FESEM. Se pudieron observar los filamentos característicos de *Leptothrix* (Figura 3.23 A, B, C y D). Se detectaron bacilos agrupados formando filas (Figura 3.23 A y C).

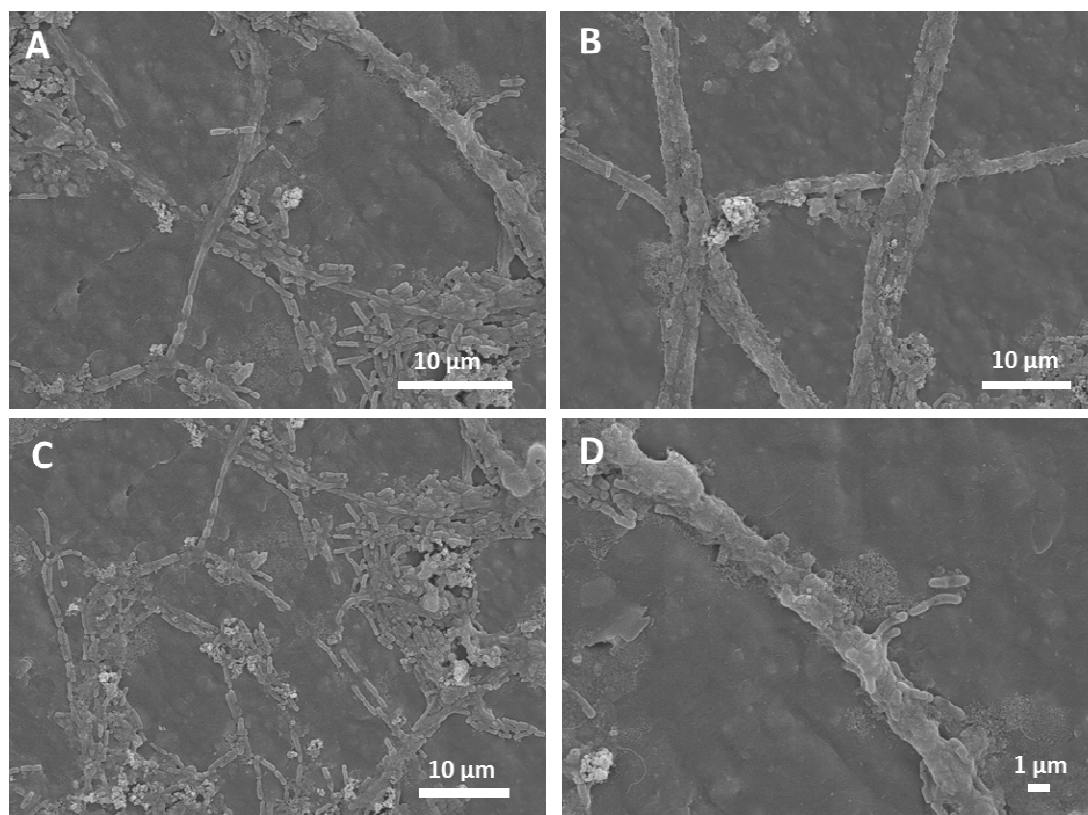


Figura 3.23 Imágenes tomadas mediante FESEM del cultivo de enriquecimiento en medio Rouf modificado de la cepa *Leptothrix cholodnii* LMG 8142. A. Filamentos característicos y bacilos en fila. B. Filamentos mineralizados. C. Gran cantidad de células bacilares, la mayor parte ordenadas en filas. D. Detalle de un filamento.

En cuanto a los análisis por FESEM de la birnesita sintética, se comprobó la estructura y morfología características de los óxidos de manganeso (Figura 3.24).

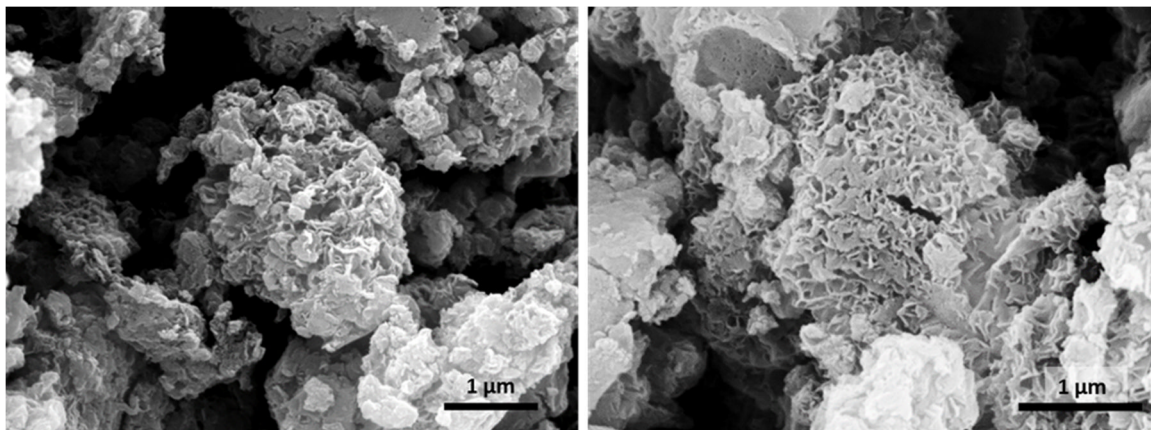


Figura 3.24 Imágenes tomadas mediante FESEM de la birnesita sintetizada en el laboratorio, mostrando la estructura característica de los óxidos de manganeso.

Los análisis FESEM de las muestras tratadas con Leucoberbelin blue-I, permitieron comprobar que el reactivo parecía no disolver completamente los óxidos de Mn y que además parecía afectar a las células microbianas, disgregándolas. Por este motivo, se decidió no aplicar de nuevo este reactivo en las muestras posteriormente estudiadas en la tesis.

Por último, los análisis llevados a cabo mediante FTIR, permitieron obtener los espectros de la birnesita sintetizada en el laboratorio (Figura 3.25 A) y de los depósitos negros precipitados en los cultivos de enriquecimiento, analizados para comprobar si se trataba de birnesita biogénica (Figura 3.25 B).

Las bandas en la región entre 800 y 400 cm^{-1} fueron asignadas a las vibraciones del grupo Mn-O. Las bandas intensas cerca de 465 y 530 cm^{-1} son indicativas de las vibraciones de los octaedros de MnO_6 , la unidad básica de los minerales de óxidos de Mn (Potter y Rossman, 1979).

En ambos espectros de birnesita, se observaron dos bandas intensas (Figura 3.25 A y B, bandas a y b) entre los 400 y 500 cm^{-1} , concretamente a los 425 (banda a) y 468 cm^{-1} (banda b). La birnesita pudo ser detectada por la presencia de estas dos bandas, las cuales son características de este mineral y permiten distinguirla de la mayoría de los otros óxidos de Mn (Potter y Rossman, 1979).

En el espectro del depósito negro del cultivo de enriquecimiento se observó una mayor variedad de picos. Las bandas características de la birnesita biogénica (Figura 3.25 B, picos a y b), mostraron menor definición e intensidad en comparación con el espectro de la birnesita sintética, además de existir ruido provocado por otros elementos orgánicos presentes.

Potter y Rossman (1979) interpretaron el patrón de bandas de la región 4000 - 1400 cm^{-1} de manera que un ión hidroxilo en una posición cristalográfica específica produciría la amplia banda que se observa en ambos espectros de birnesita entre los 3600 y 3000 cm^{-1} (Figura 3.25 A y B).

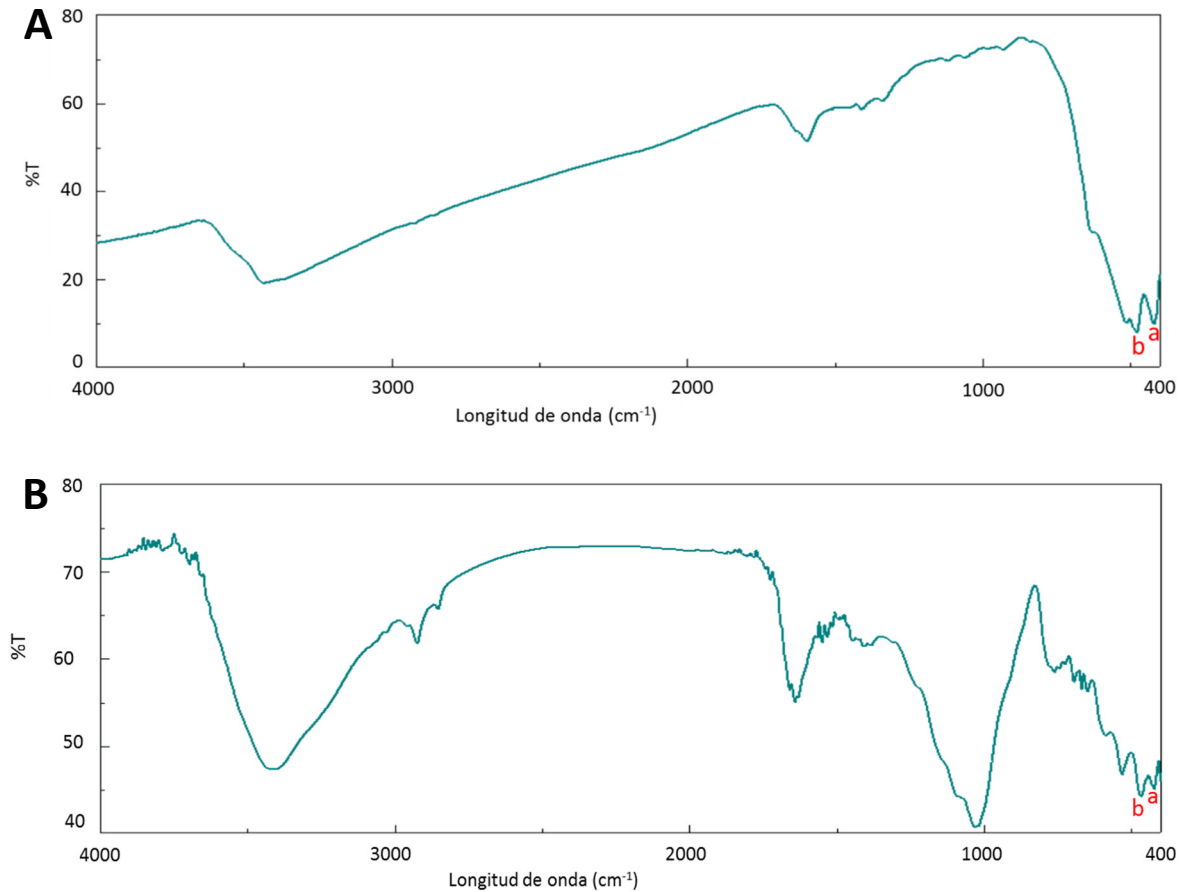


Figura 3.25 Espectros de absorción de FTIR, representando longitud de onda (cm^{-1}) respecto a la Absorbancia. Las anotaciones a y b indican los picos en la zona de los 425 y 468 cm^{-1} , respectivamente. A. Birnesita sintética obtenida en el laboratorio. B. Precipitado negro depositado en el fondo de un frasco con cultivo de enriquecimiento en medio Rouf modificado de la muestra 0313T2A.

3.3.2 MUESTRA DE MOONMILK 0710T2-6F

➤ Estudio de las comunidades microbianas de la muestra natural de moonmilk 0710T2-6F mediante genotecas de ADN

Para la caracterización de las comunidades microbianas asociadas con el moonmilk del túnel de Paranhos, se construyeron genotecas de bacterias, arqueas y hongos. Se emplearon 155 secuencias de alta calidad y libres de quimeras para los análisis finales, de un total de 207 clones secuenciados. Para cada comunidad microbiana se construyó una genoteca de ADN, con el fin de detectar los microorganismos totales presentes en la muestra de moonmilk objeto de estudio.

La distribución de los diferentes filos microbianos en la muestra se presenta en la Figura 3.26.

La mayoría de los clones bacterianos analizados (Figura 3.26 A, Tabla 3.12) se incluyeron en el filo Actinobacteria (52%), principalmente representado por el género *Pseudonocardia* (93,6% de ellos). Prácticamente todos los OTUs afiliados al género *Pseudonocardia* (12 de 14 OTUs) tuvieron como identificación molecular más cercana a la especie *Pseudonocardia hispaniensis* (Tabla 3.12). Una fracción significativa de los clones perteneció al filo Proteobacteria (44%), representado por las clases Alphaproteobacteria (23%), Gammaproteobacteria (14%), Betaproteobacteria (5%) y Deltaproteobacteria (2%) (Figura 3.26 A). Algunos de los clones de Alphaproteobacteria se afiliaron a los géneros *Hyphomicrobium* (5,5%) y *Pedomicrobium* (1,1%). En lo que respecta a la clase Gammaproteobacteria, el género predominante fue *Panacagrimonas* (5,5%). Además, también se detectaron clones pertenecientes a Acidobacteria (2%), Bacteroidetes (1%) y Firmicutes (1%), la mayoría de ellos con una baja similitud (Tabla 3.12).

De los clones obtenidos de arqueas, el 77% estuvo afiliado a Thaumarchaeota. El único clon identificable fue *Candidatus Nitrosoarchaeum limnia*; el resto presentaba similitudes bajas que impidieron una identificación de género. El 23% de los clones restante correspondió a arqueas sin clasificar (Figura 3.26 B, Tabla 3.13).

En la genoteca de hongos (región ITS) se obtuvieron 25 clones, comprendiendo 13 OTUs (Tabla 3.14), con unos porcentajes del 72% de Ascomycota, 4% de Basidiomycota y 24% de eucariotas sin clasificar (Figura 3.26 C). El hongo *Cladosporium* fue el más abundante, representando el 41,7% de los clones, seguido por *Alternaria* (12,5%) y *Gymnascella* (8,3%).

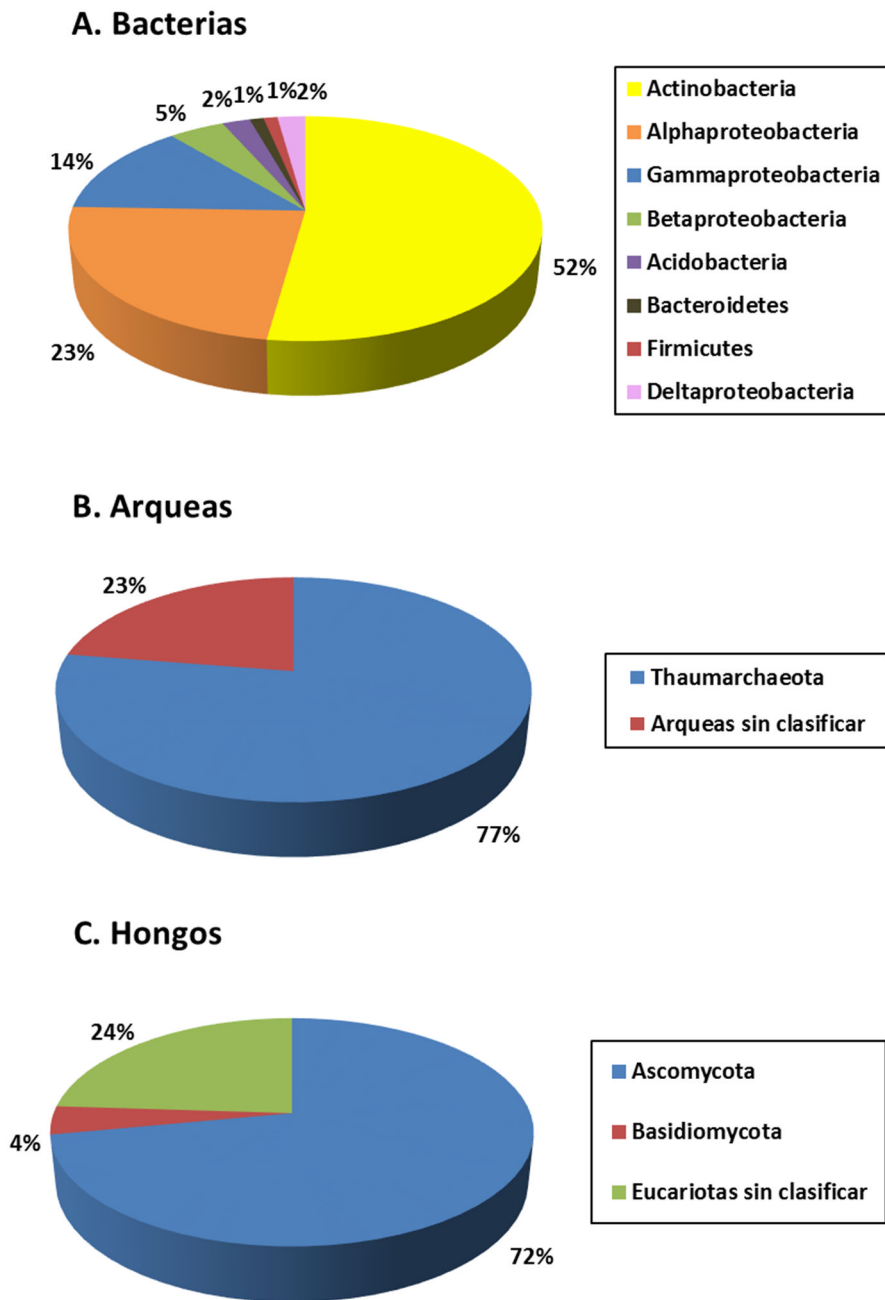


Figura 3.26 Distribución de filos en la muestra de moonmilk 0710T2-6F. A. Genoteca de ADN de bacterias. B. Genoteca de ADN de arqueas. C. Genoteca de ADN de hongos.

Las afiliaciones filogenéticas de los clones secuenciados de la muestra de moonmilk del túnel de Paranhos mostraron similitudes con bacterias no cultivadas de una amplia variedad de procedencias: diferentes tipos de aguas, desde dulces y subterráneas hasta incluso residuales, suelos y sedimentos, diversas cuevas y tubos de lava (en EE.UU., Francia, Portugal, Eslovenia y España), minas, lodo activado, superficie de espeleotemas, biofilms, etc. (Tablas 3.12, 3.13, 3.14).

Tabla 3.12 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias totales obtenidas de la muestra 0710T2-6F (90 secuencias, 55 OTUs).

Clon repr. (nº acceso)	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Actinobacteria						
6FBA4 (HG008829)	22	<i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (FR695486)	Aguas residuales	96	<i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (FR695486)	98
6FBF2 (HG008830)	9	Bacteria no cultivada (JX098342)	Suelos minerales	95	<i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (FR695486)	97
6FBB1 (HG008831)	2	<i>Actinobispora</i> sp. (EU274329)	Suelo	97	<i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (FR695486)	98
6FBC9 (HG008832)	1	<i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (FR695486)	Aguas residuales	93	<i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (FR695486)	95
6FBG4 (HG008833)	1	<i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (FR695486)	Aguas residuales	93	<i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (FR695486)	95
6FBA11 (HG008834)	1	Bacteria no cultivada (JX098342)	Suelos minerales	93	<i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (FR695486)	94
6FBD7 (HG008835)	1	Bacteria no cultivada (JX098323)	Suelos minerales	91	<i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (FR695486)	93
6FBD8 (HG008836)	1	Bacteria no cultivada (JX098798)	Suelos minerales	95	<i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (FR695486)	94
6FBC5 (HG008837)	1	Bacteria no cultivada (GQ495403)	Roca volcánica	97	<i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (FR695486)	97
6FBH3 (HG008838)	1	Bacteria no cultivada (HM445437)	Biofilm en tubo de lava	94	<i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (FR695486)	94
6FBA1 (HG008839)	1	<i>Actinobispora</i> sp. (EU274329)	Suelo	93	<i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (FR695486)	95
6FBA2 (HG008840)	1	Bacteria no cultivada (GQ065789)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	93	<i>Pseudonocardia benzenivorans</i> (AJ556156)	92
6FBA9 (HG008841)	1	<i>Pseudonocardia</i> sp. (EU677789)	Suelo de rizosfera	86	<i>Pseudonocardia seranimata</i> (FJ817379)	88
6FBD1 (HG008842)	1	Bacteria no cultivada (JX098342)	Suelos minerales	95	<i>Pseudonocardia hispaniensis</i> (FR695486)	97
6FBB7 (HG008843)	1	Bacteria no cultivada (JN178925)	Espeleotema	92	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	88
6FBH6 (HG008844)	1	<i>Mycobacterium</i> sp. (DQ249999)	Cavernas Kartchner	97	<i>Mycobacterium fallax</i> (AF480600)	93
6FBC7 (HG008845)	1	Bacteria no cultivada (EF020175)	Rizosfera	87	<i>Saccharomonospora marina</i> (CM001439)	83
Alphaproteobacteria						
6FBA6 (HG008846)	2	Bacteria no cultivada (JN592703)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Hyphomicrobium vulgare</i> (Y14302)	93
6FBA12 (HG008847)	2	Bacteria no cultivada (HQ121112)	Arena arcillosa	99	<i>Azospirillum rugosum</i> (AM419042)	90
6FBD2 (HG008848)	1	Bacteria no cultivada (HQ121112)	Arena arcillosa	98	<i>Elstera litoralis</i> (EU678309)	89
6FBD3 (HG008849)	1	Bacteria no cultivada (JN592703)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Pedomicrobium manganicum</i> (X97691)	96
6FBE3 (HG008850)	1	Bacteria no cultivada (EU133559)	Suelo de una pradera	90	<i>Candidatus Sphaeronema italicum</i> (AY428765)	87
6FBF12 (HG008851)	1	Bacteria no cultivada (EU133369)	Suelo de una pradera	97	<i>Candidatus Sphaeronema italicum</i> (AY428765)	88
6FBG6 (HG008852)	1	Bacteria no cultivada (JN616189)	Biofilm en tubo de lava	95	<i>Bauldia consociata</i> (FJ560750)	91

6FBG8 (HG008853)	1	Alphaproteobacteria no cultivada (FJ535079)	Biofilm en la pared de la Cueva Pajsarjeva	93	<i>Thermovum composti</i> (AB563785)	91
6FBH7 (HG008854)	1	Bacteria no cultivada (JF266548)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i> (Y14305)	96
6FBH8 (HG008855)	1	Bacteria no cultivada (EU488001)	Biofilm en tubo de lava	91	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> (Y14304)	88
6FBH9 (HG008856)	1	Alphaproteobacteria no cultivada (HE614773)	Biofilm en una roca de una mina de oro	96	<i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i> (AF235089)	94
6FBF3 (HG008857)	1	Bacteria no cultivada (EU133255)	Suelo de una pradera	97	<i>Dongia mobilis</i> (FJ455532)	91
6FBF7 (HG008858)	1	Bacteria no cultivada (EU133588)	Suelo de una pradera	87	<i>Mesorhizobium loti</i> (AXAE01000021)	86
6FBB9 (HG008859)	1	Bacteria no cultivada (AB294313)	Aguas subterráneas	98	<i>Blastochloris sulfovirdis</i> (D86514)	91
6FBC12(HG008860)	1	Bacteria no cultivada (JQ675501)	Cavernas Carlsbad	99	<i>Reyranella soli</i> (JX260424)	99
6FBF9 (HG008861)	1	Bacteria no cultivada (GU455159)	Lodo activado	97	<i>Oligotropha carboxidovorans</i> (CP002826)	93
6FBH11(HG008862)	1	Bacteria no cultivada (DQ125654)	Suelo contaminado	94	<i>Pseudolabrys taiwanensis</i> (DQ062742)	93
6FBH2 (HG008863)	1	Alphaproteobacteria no cultivada (AY429692)	Agua subterránea contaminada	99	<i>Amaricoccus macauensis</i> (U88042)	91
6FBD10(HG008864)	1	Bacteria no cultivada (KJ782898)	Aguas residuales	96	<i>Parvibaculum hydrocarboniclasticum</i> (GU574708)	92
Gammaproteobacteria						
6FBB4 (HG008865)	3	Bacteria no cultivada (JQ407965)	Aguas residuales	98	<i>Pseudofulvimonas gallinarii</i> (FN298515)	96
6FBE11(HG008866)	2	Bacteria no cultivada (HE602880)	Cueva de Altamira	99	<i>Panacagrimonas perspica</i> (AB257720)	97
6FBF1 (HG008867)	1	Bacteria no cultivada (JQ675464)	Cavernas Carlsbad	98	<i>Panacagrimonas perspica</i> (AB257720)	98
6FBG11(HG008868)	1	Bacteria no cultivada (HM277149)	Piel, hueso poplíteo	94	<i>Panacagrimonas perspica</i> (AB257720)	94
6FBD4 (HG008869)	1	<i>Xanthomonadaceae</i> no cultivada (AM936440)	Suelo contaminado con hidrocarburos	82	<i>Panacagrimonas perspica</i> (AB257720)	81
6FBE4 (HG008870)	1	Bacteria no cultivada (HQ119992)	Arena arcillosa	96	<i>Pseudofulvimonas gallinarii</i> (FN298515)	92
6FBA3 (HG008871)	1	Bacteria no cultivada (JQ675502)	Cavernas Carlsbad	99	<i>Nevskia terrae</i> (GQ845011)	90
6FBB8 (HG008872)	1	Bacteria no cultivada (KJ615253)	Filtro de carbón granulado	98	<i>Ectothiorhodospira magna</i> (HM149323)	87
6FBE5 (HG008873)	1	Bacteria no cultivada (HM749729)	Biofilm en tubo de lava	90	<i>Silanimonas mangrove</i> (HE573746)	87
Betaproteobacteria						
6FBA5 (HG008874)	1	Bacteria no cultivada (EU133779)	Suelo de una pradera	93	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (Y10146)	88
6FBC4 (HG008875)	1	Bacteria no cultivada (AJ295484)	Rizoplano	96	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (Y10146)	89
6FBC2 (HG008876)	1	Betaproteobacteria no cultivada	Suelo de rizosfera	91	<i>Rhizobacter dauci</i> (AB297965)	89

Capítulo 3

6FBC3 (HG008877)	1	(HE860775) Bacteria no cultivada (GQ397030)	Suelo deshelado	98	<i>Cupriavidus gilardii</i> (EU024163)	91
Deltaproteobacteria						
6FBA7 (HG008878)	1	Deltaproteobacteria no cultivada (JN178913)	Superficie de espeleotema	99	<i>Desulfosalsimonas propionica</i> (DQ067422)	86
6FBE12(HG008879)	1	Bacteria no cultivada (HM445084)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Desulfuromonas michiganensis</i> (AF357915)	86
Acidobacteria						
6FBE9 (HG008880)	1	Acidobacteria no cultivada (DQ139447)	Biofilm de catacumba	100	<i>Aridibacter kavangonensis</i> (KF245633)	96
6FBH10(HG008881)	1	Bacteria no cultivada (EU132280)	Suelo de pradera	99	<i>Aridibacter kavangonensis</i> (KF245633)	87
Bacteroidetes						
6FBC1 (HG008882)	1	Bacteria no cultivada (JQ769672)	Mina de cobre	92	<i>Lewinella nigricans</i> (AB301615)	83
Firmicutes						
6FBC8 (HG008883)	1	Bacteria no cultivada (EU048666)	Sedimento marino	90	<i>Oceanirhabdus sediminicola</i> (EU048666)	83

Tabla 3.13 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las arqueas totales obtenidas de la muestra 0710T2-6F (40 secuencias, 9 OTUs).

Clon repr. (nº acceso)	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Thaumarchaeota						
6FAH5 (HG008884)	11	Arquea no cultivada (KC437252)	Agua carbonatada de un manantial	99	Candidatus <i>Cenarchaeum symbiosum</i> (DP000238)	90
6FAF3 (HG008885)	10	Crenarchaeote no cultivado (JN820160)	Ferromanganeso	99	Candidatus <i>Cenarchaeum symbiosum</i> (DP000238)	92
6FAE5 (HG008886)	8	Arquea no cultivada (KC604545)	Aguas subterráneas	99	Candidatus <i>Nitrosoarchaeum koreensis</i> (HQ331116)	93
6FAH1 (HG008887)	2	Arquea no cultivada (AB550808)	Agua de río	99	Candidatus <i>Nitrosoarchaeum limnia</i> (CM001158)	99
Arqueas sin clasificar*						
6FAC4 (HG008888)	3	Euryarchaeote no cultivado (AB380105)	Suelo de campo de arroz	99	-	-
6FAA4 (HG008889)	2	Thermoplasmata no cultivado (JN002476)	Dunita serpentizada	99	-	-
6FAC1 (HG008890)	2	Arquea no cultivada (JN002476)	Microbialita	99	-	-
6FAD4 (HG008891)	1	Euryarchaeote no cultivado (JN820183)	Ferromanganeso	90	-	-
6FAH8 (HG008892)	1	Arquea no cultivada (HG325813)	Depósito rojo en túnel de granito de Paranhos	99	-	-

Nota: De los 63 clones secuenciados, 15 secuencias bacterianas (pertenecientes a Actinobacteria, Firmicutes, Deltaproteobacteria y Acidobacteria) fueron excluidas, y un total de 40 secuencias de gran calidad fueron usadas para los análisis finales.

*No fue posible clasificar los OTUs con un porcentaje de similitud menor del 80% (EzTaxon), por lo que no se especifica la especie cultivada más cercana.

Tabla 3.14 Relaciones filogenéticas de las secuencias de la región ITS de los hongos totales procedentes de la muestra 0710T2-6F (25 secuencias, 13 OTUs).

Clon repr. (nº acceso)	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud % (cobertura %)* ¹
Ascomycota				
6FFC9 (HG008768)	10	<i>Cladosporium</i> sp. no cultivado (KM062089)	Roca biotratada (Capilla Real de Granada, España)	99
6FFA12 (HG008769)	3	<i>Lewia</i> sp. no cultivado (HF947047)	Filosfera (Magnesia, Grecia)	100
6FFD7 (HG008770)	2	<i>Gymnascella</i> sp. no cultivado (HE605247)	Mancha negra, pared de la Cueva de Lascaux (Francia)	99
6FFA8 (HG008771)	1	<i>Epicoccum nigrum</i> (AB975291)	<i>Salicornia europaea</i> (Japón)	99
6FFF10 (HG008772)	1	<i>Verticillium</i> sp. no cultivado (HE664132)	Muestra de aire de la Cueva de Lascaux (Francia)	99
6FFD8 (HG008773)	1	Hongo no cultivado (DQ420829)	Suelo (Minnesota, EE.UU.)	99
Basidiomycota				
6FFD12 (HG008774)	1	<i>Serpula himantioides</i> (GU187545)	Pared de ladrillo de una casa (Bélgica)	99
Eucariotas sin clasificar * ²				
6FFB9 (HG008775)	1	<i>Staurostrum orbiculare</i> (AJ829660)	No especificada	88 (22)
6FFC7 (HG008776)	1	Hongo no cultivado (KC965193)	Suelo (Canadá)	82 (41)
6FFC11 (HG008777)	1	Ciliado no cultivado (HQ219418)	Lago Aydat (Francia), dimítico y eutrófico	95 (40)
6FFE12 (HG008778)	1	<i>Leucoagaricus</i> sp. (EU561513)	Hormiga (<i>Trachymyrmex septentrionalis</i>)	86 (27)
6FFG9 (HG008779)	1	Hongo no cultivado (EF635712)	Suelo alpino carente de vegetación (Austria)	75 (79)
6FFH12 (HG008780)	1	<i>Capsaspora owczarzaki</i> (AY363957)	Caracol pulmonado (<i>Biomphalaria glabrata</i>)	89 (33)

Nota: De 48 clones secuenciados, un total de 25 secuencias de gran calidad se emplearon en los análisis finales.

*¹ Se muestra entre paréntesis únicamente los porcentajes de cobertura de alineamiento bajos.

*² Los OTUs con bajo porcentaje de cobertura de alineamiento no se pudieron clasificar.

En el análisis matemático de la distribución de las secuencias de los clones se obtuvieron curvas de rarefacción para estimar la biodiversidad en la muestra de moonmilk (Figuras 3.27 y 3.28). Las generadas a nivel de especie (97% de similitud) no alcanzaron la fase de saturación ni en la comunidad de bacterias (Figura 3.27 A) ni en la de hongos (Figura 3.28), lo que en principio sugiere que podría ser preciso realizar un mayor número de secuenciaciones para detectar filotipos adicionales en el caso de estos microorganismos. En la comunidad de arqueas sí alcanzaron la fase de saturación, indicando una muy buena cobertura de la biodiversidad (Figura 3.27 B).

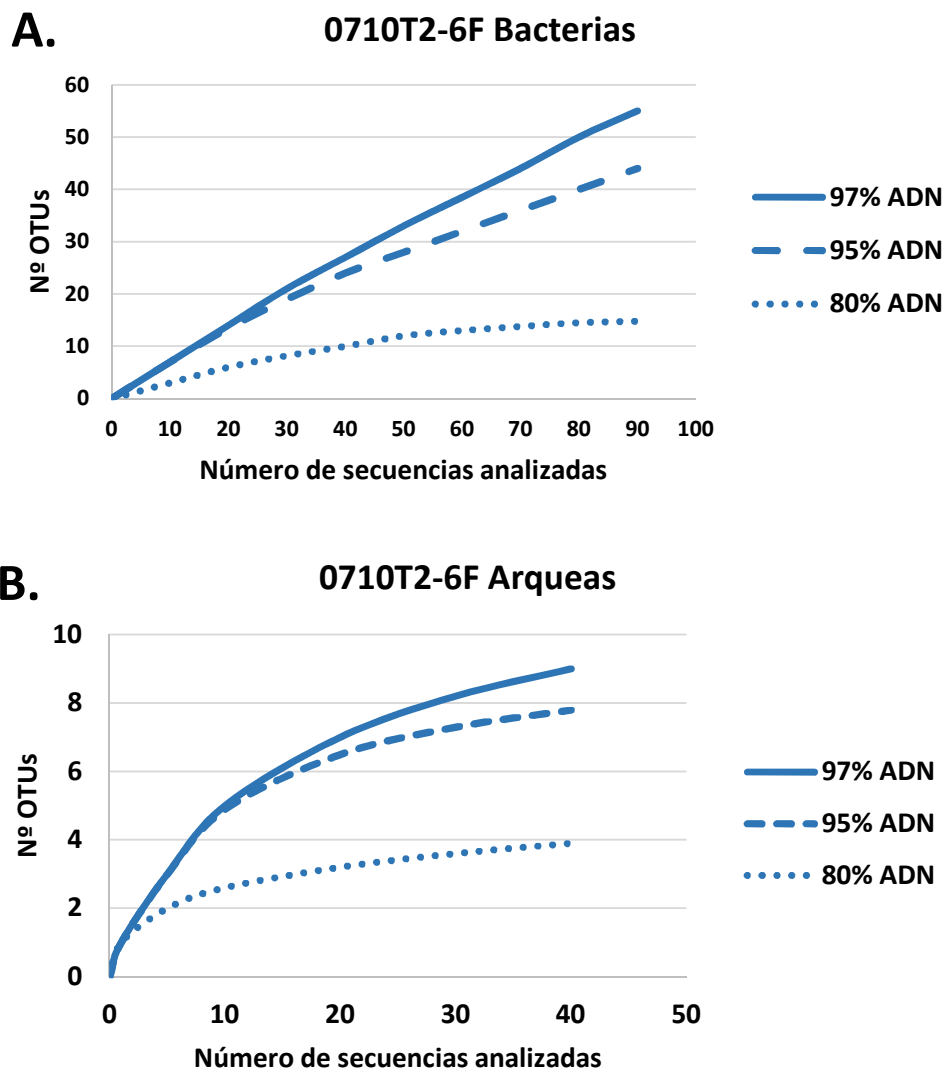


Figura 3.27 Curvas de rarefacción de la muestra de moonmilk 0710T2-6F. A. Bacterias. B. Arqueas. Se representa el número de secuencias analizadas frente al número de OTUs generados a tres niveles de similitud: especie (97%), género (95%) y filo (80%). Genoteca de ADN (—).

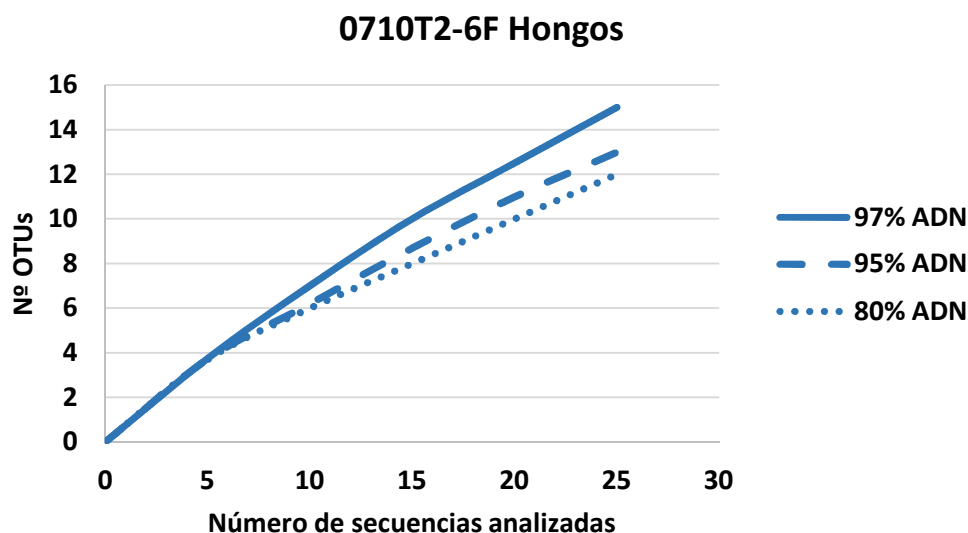


Figura 3.28 Curvas de rarefacción de las secuencias del análisis de la región ITS de la muestra de moonmilk 0710T2-6F. Se representa el número de secuencias analizadas frente al número de OTUs generados a tres niveles de similitud: especie (97%), género (95%) y filo (80%). Genoteca de ADN (—).

Las curvas de rarefacción de la comunidad bacteriana mostraron una amplia diversidad a nivel de especie (Figura 3.27 A). Al 97% de similitud, los 90 clones analizados se incluyeron en 55 OTUs. Para la comunidad de arqueas, a pesar del bajo número de clones analizados (40) tras la exclusión de secuencias bacterianas amplificadas con cebadores específicos de arqueas, las curvas de rarefacción mostraron tendencia a la fase estacionaria, detectando únicamente 9 OTUs a nivel de especie (Figura 3.27 B). Para la comunidad fúngica, las curvas siguieron un patrón similar al de la comunidad bacteriana, debido al escaso número de clones analizados (25) (Figura 3.28).

Las comunidades de hongos muestran una elevada diversidad, ya que ninguna de las curvas se aproxima a la saturación. Concretamente, a un nivel de similitud del 95%, se detectaron 13 OTUs diferentes. Al 80% de similitud, correspondiente al nivel de género, sólo se detectó un OTU menos (12). Esto se debe a que los OTUs están muy distantes taxonómicamente ya que, como se aprecia en la Tabla 3.14, corresponden a grupos de hongos muy diferentes y otros eucariotas desconocidos (6 OTUs).

➤ Caracterización morfológica

Los análisis mediante microscopía electrónica FESEM realizados sobre las muestras de moonmilk del túnel de Paranhos, permitieron poner de manifiesto la estructura, también característica, del moonmilk, observándose las fibras individuales de calcita con forma de aguja (“needle fibre calcite”, NFC) (Figura 3.29), ricas en calcio según el microanálisis EDS.

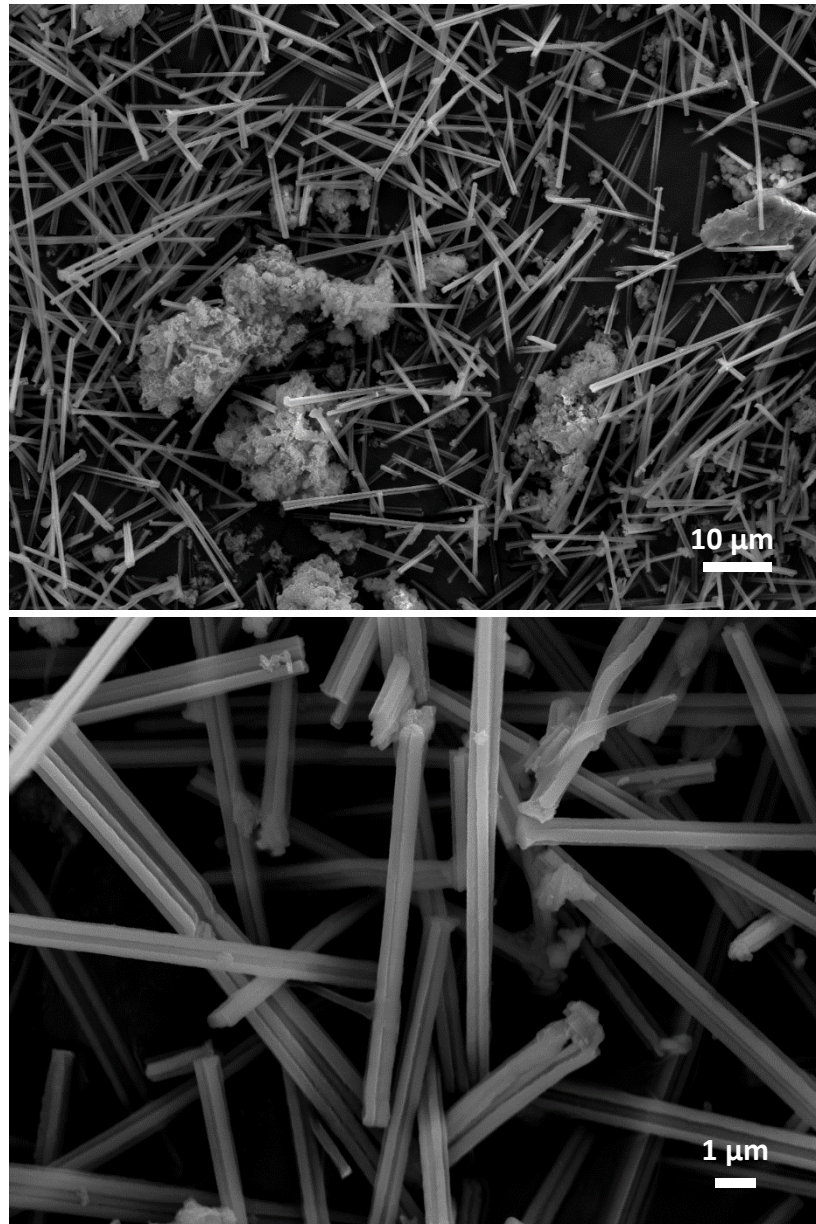


Figura 3.29 Imágenes tomadas mediante FESEM de la muestra de moonmilk del túnel de Paranhos, mostrando las fibras de calcita con forma de aguja (needle fibre calcite, NFC).

3.4 DISCUSIÓN

3.4.1 MUESTRAS DE DEPÓSITOS NEGROS 0212T2A y 0313T2A

➤ Cepas aisladas

De acuerdo con Miller y col. (2012b) y Sanz-Rubio y col. (2013), a lo largo del año existe un alto grado de estabilidad en las condiciones medioambientales subterráneas del túnel de Oporto, en lo que respecta a la temperatura ($\pm 20^{\circ}\text{C}$) y la humedad relativa (alrededor del 100%), motivo que podría explicar la similitud de cepas aisladas obtenidas de las muestras de depósitos negros de ambas campañas de muestreo.

La mayor parte de las bacterias aisladas de este trabajo correspondieron a la clase Gammaproteobacteria, mientras que en el realizado por Miller y col. (2012b), en el que se llevó a cabo la caracterización microbiana de los depósitos negros de ferromanganeso del túnel de Paranhos muestreados en el año 2009, el filo Actinobacteria fue el más representado. Gran cantidad de los aislamientos obtenidos por Miller y col. (2012b) pertenecieron a *Streptomyces* sp., hecho que contrasta con los pocos que han sido aislados en esta tesis, lo que podría deberse a que los medios de cultivo empleados tuvieron una composición diferente y pudieron favorecer en menor grado la obtención de cepas de este género.

Las cepas aisladas correspondientes a *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp. y *Streptomyces* sp. son bacterias comunes en las superficies rocosas de los ambientes subterráneos (Jurado y col., 2010; De Leo y col., 2012; Sterflinger y Piñar, 2013).

➤ **Influencia de las condiciones ambientales y geoquímicas del túnel de Paranhos en las comunidades microbianas**

Las afiliaciones filogenéticas de los clones secuenciados de los cultivos de enriquecimiento mostraron similitudes con bacterias aisladas de suelos afectados por distintos contaminantes como metales, hidrocarburos, pesticidas y tricloroetileno (*Pseudomonas putida*, *Herbaspirillum* sp., *Cupriavidus* sp., *Janthinobacterium* sp.) y aguas residuales (*Clostridium* sp.). Estudios hidrogeoquímicos previos, llevados a cabo por Afonso y col. (2010b), indicaron que el túnel de Paranhos posee una alta vulnerabilidad a la contaminación. La calidad del agua subterránea, con una composición rica en nitratos y sulfatos, fue atribuida a fuentes de contaminación antropogénicas, tales como el drenaje urbano, sistemas de alcantarillado y actividades agrícolas. La colonización microbiana de los ambientes subterráneos está bastante relacionada con la actividad antropogénica en superficie.

La clase Gammaproteobacteria aparece frecuentemente en ambientes subterráneos contaminados debido a su capacidad de adaptación a condiciones ambientales variables (Miller y col., 2012b). De hecho, la enorme abundancia de *Pseudomonas* spp. en los cultivos de enriquecimiento de la muestra tomada en el año 2012 fue consistente con las fuentes potenciales de contaminación que se mostraron en la Figura 3.1, por lo que puede deducirse que en la zona del túnel dónde se recogieron las muestras existían infiltraciones derivadas de estos lugares, además de infiltraciones de alcantarillado. Si además se tiene en cuenta que muchas especies de *Pseudomonas* son capaces de crecer y degradar compuestos del petróleo (Mulet y col., 2011), resultaría lógico que en un ambiente contaminado con hidrocarburos provenientes de las gasolineras, garajes y talleres de la superficie fueran abundantes estas bacterias. Precisamente, *Pseudomonas anguilliseptica* y *Pseudomonas putida* fueron algunas de las especies más abundantes presentes en el vertido del Prestige

(Mulet y col., 2011), formando también parte tanto de los aislamientos como de las genotecas de los cultivos de enriquecimiento obtenidos en este trabajo. Estos datos concordaron a su vez con los obtenidos por Miller y col. (2012b), en el que la importante presencia de Gammaproteobacteria fue atribuida a las aguas de infiltración derivadas de la rotura de tuberías de aguas residuales.

Incluso a pesar de que las comunidades bacterianas del cultivo de enriquecimiento marrón de la muestra 0313T2A se vieron modificadas respecto al cultivo negro, siguieron estando muy presentes bacterias procedentes de ambientes contaminados, especialmente en la clase Betaproteobacteria, representada por la especie *Cupriavidus necator*, lo que indicó que los componentes contaminantes provenientes de las muestras de Oporto no desaparecían con el cambio de color y seguían favoreciendo el desarrollo de este tipo de bacterias. Una de las principales características de *Cupriavidus necator* es su resistencia a metales pesados (Poehlein y col., 2011), lo que pudo conferirle una habilidad especial para desarrollarse en el ambiente de la mina de agua de Oporto. Únicamente en este cultivo de enriquecimiento marrón se detectó una secuencia cercana a la especie *Hoeflea olei*, perteneciente a la clase Alphaproteobacteria y procedente de aguas estancadas negras contaminadas con gasóleo, con la capacidad de degradar este tipo de compuesto (Rahul y col., 2015).

En este sentido hay que tener en cuenta también el compuesto porfirínico detectado mediante los análisis de Micro-Raman (Figura 3.18). Existe un grupo de pigmentos azules y verdes, compuestos ftalocianínicos, que aportan unas señales típicas debido a la presencia de un macrociclo en su estructura orgánica. Los espectros de Raman de estos compuestos presentan generalmente una o más bandas de gran intensidad entre los 750-800 cm^{-1} y a los 680 cm^{-1} , debido a las vibraciones del macrociclo (Schulte y col., 2008), así como una banda intensa a los 1540 cm^{-1} . El espectro de Raman obtenido mostró bandas muy intensas a los 1535, 746 y 680 cm^{-1} (Figura 3.18), sugiriendo la presencia de ftalocianina de cobre en las muestras de los depósitos negros. Se trata de un pigmento azul usado frecuentemente en la manufactura de esmaltes, tintas de impresión y acabados de automóviles. Su presencia es consistente con la existencia de gasolineras, garajes y talleres en la superficie del túnel de Paranhos (Figura 3.1), lo que sustenta aún más la idea de que se producen infiltraciones desde la superficie de la mina de agua.

➤ **Concordancia entre los datos de las genotecas de los cultivos de enriquecimiento, genotecas de las muestras naturales y las cepas aisladas**

En general, aunque la comunidad bacteriana que se obtiene mediante análisis de genotecas y la que se aísla no suelen coincidir, se observó una elevada concordancia entre las bacterias aisladas y los clones de los cultivos de enriquecimiento de las muestras de depósitos negros. La clase Gammaproteobacteria

fue la más representada en las bacterias aisladas, seguida del filo Firmicutes. Los clones del cultivo de enriquecimiento de la muestra de 2012 se asignaron mayoritariamente a la clase Gammaproteobacteria, aunque Firmicutes poseyó una buena representación en el cultivo de enriquecimiento negro de la muestra de 2013. Los géneros obtenidos en las bacterias aisladas también se encontraron en su mayoría en los clones de los cultivos de enriquecimiento, como *Pseudomonas* sp., *Paenibacillus* sp., *Bacillus* sp., *Ensifer* sp. y *Arthrobacter* sp.

Por el contrario, al comparar las bacterias aisladas con las genotecas obtenidas de las muestras naturales sí se apreciaron mayores diferencias. Uno de los problemas al aislar algunos microorganismos que se detectan mediante el análisis de clones en el laboratorio es que su tiempo de multiplicación es lento comparado con otros, de manera que no pueden competir por los nutrientes en un medio de cultivo artificial. Con objeto de aislar estos microorganismos, es preciso emplear diversas técnicas, como el uso de medios selectivos o el empleo de pretratamientos antes de sembrar las muestras (Yashiro y col., 2011). La explicación de por qué las bacterias aisladas de las muestras de depósitos negros fueron más similares a las de los clones de los cultivos de enriquecimiento que a las de los obtenidos de las muestras naturales es obvia: el cultivo de enriquecimiento es un medio de cultivo líquido, de ahí la similitud de especies obtenidas respecto al cultivo en medio sólido. Sin embargo, es posible hallar algunas semejanzas entre las bacterias aisladas y las genotecas de las muestras naturales del túnel de Paranhos, como el hecho de que, al igual que gran parte de las especies aisladas pertenecieron al género *Pseudomonas* (36%), en las comunidad metabólicamente activa de la muestra 0313T2A se detectó asimismo *Pseudomonas* sp. (6,5%), siendo en la que mejor representación obtuvieron las gammaproteobacterias (14% del total).

La diversidad bacteriana obtenida fue mucho mayor en el caso de las muestras naturales de los depósitos de ferromanganeso frente a la obtenida de sus cultivos de enriquecimiento, hecho que resulta lógico porque en estas genotecas quedaron incluidos los ácidos nucleicos de todos los microorganismos y no únicamente aquellos que se vieron favorecidos en su crecimiento por los componentes del cultivo de enriquecimiento. De nuevo se detectó una importante cantidad de bacterias que fueron anteriormente aisladas de ambientes contaminados, estando en consonancia con los datos obtenidos de los cultivos de enriquecimiento. Gran parte de ellas fueron bacterias no cultivadas distribuidas por los distintos filos, pero se pudo constatar también la presencia de *Cupriavidus* sp. en ambas muestras. Concretamente, la existencia de *Cupriavidus necator* en la comunidad metabólicamente activa de la muestra 0313T2A explicaría la obtención de bastantes secuencias de este género en el cultivo de enriquecimiento marrón de dicha muestra, puesto que pudo haberse favorecido su crecimiento.

Además, las afiliaciones filogenéticas de los clones secuenciados de las muestras naturales mostraron similitudes con otras betaproteobacterias relacionadas también con estos ambientes, como *Thauera aminoaromatica*, en la comunidad metabólicamente activa de la muestra 0212T2A, capaz también de degradar compuestos aromáticos (Mechichi y col., 2002).

Por otra parte, la clase Alphaproteobacteria estuvo bien representada en todas las genotecas de las muestras naturales de los depósitos de ferromanganeso, debido a que, al igual que Gammaproteobacteria, también poseen buena capacidad de adaptación ante condiciones ambientales diversas (Miller y col., 2012b).

También llamó la atención que muchas de las bacterias de las genotecas de las muestras naturales 0212T2A y 0313T2A procederían de ambientes subterráneos con características similares al túnel de Oporto. De hecho, un 3,8% del total de bacterias se aislaron de unos depósitos de color rojo en las paredes de granito del propio túnel. Otras fuentes de aislamiento de cepas similares a las bacterias de estas genotecas fueron unos depósitos de ferromanganeso obtenidos de la Cueva de Altamira y biofilms microbianos de diversas cuevas, entre los que tienen una gran presencia los desarrollados sobre las paredes de tubos de lava de las diversas islas del archipiélago de Azores. La similitud con bacterias no cultivadas de tubos de lava también se comprobó en las secuencias obtenidas por Miller y col. (2012b). Dichos datos recalcan la capacidad de estos microorganismos de crecer en ambientes subterráneos, los cuales probablemente compartan ciertas características que permitan el desarrollo de estas comunidades.

Además, en los clones de las muestras naturales 0212T2A y 0313T2A existió una cantidad moderada de bacterias afiliadas al filo Actinobacteria, de manera que no llegaron a ocupar porcentajes demasiado altos del total, estando en consonancia con las pocas que se aislaron de los medios de cultivo sólidos, así como con los datos del estudio de Miller y col. (2012b), en el que las actinobacterias únicamente representaron un 4,9% de todos los clones obtenidos. Puede deducirse que las actinobacterias no son, al menos en un principio, una comunidad muy extendida en esta clase de depósitos negros.

Aunque las comunidades fluctúan a lo largo de los años, puesto que se han observado diferencias entre las genotecas de las muestras de depósitos negros del año 2009 (Miller y col., 2012b), 2012 y 2013, se mantienen ciertos esquemas, como la permanencia de gammaproteobacterias y otras bacterias con apetencia por ambientes contaminados y la poca frecuencia de actinobacterias.

➤ **Biom mineralización relacionada con el Mn y el Fe**

Al igual que en Miller y col., (2012b) y, a pesar de que las muestras poseían una composición rica en óxidos de manganeso, la mayor parte de los clones de

las genotecas de las muestras naturales no mostraron afiliación cercana con bacterias conocidas por ser oxidantes de manganeso, con la excepción de las identificadas como *Hyphomicrobium* spp. y *Pedomicrobium* spp.. Este tipo de microorganismos se identificaron también en depósitos de ferromanganeso de la Cueva Lechuguilla y la Cueva de la Araña (EE.UU.) (Northup y col., 2003).

Los géneros *Hyphomicrobium* y *Pedomicrobium* son bacterias filamentosas capaces de oxidar el manganeso e inducir su precipitación (Manolache y Onac, 2000). La homología de muchos clones con la familia *Hyphomicrobiaceae* en las muestras 0212T2A y 0313T2A, tanto en la comunidad total como en la metabólicamente activa, sugiere que las bacterias halladas podrían estar implicadas en la oxidación del manganeso al igual que sus homólogos cercanos, y por tanto en procesos de biomineralización en el túnel de Paranhos. Concretamente, *Pedomicrobium manganicum* fue aislado por primera vez por Sly y col. (1988) de unos biofilms con depósitos de manganeso en un sistema de distribución de agua potable en Australia, siendo conocido por su capacidad de oxidar dicho compuesto químico. Esta especie se detectó en la comunidad metabólicamente activa de la muestra 0212T2A. Por su parte, *Hyphomicrobium aestuarii* fue una de las especies que presentó una alta afiliación de secuencias en la comunidad total de la muestra de 2012.

El hecho de que estos microorganismos no hayan podido aislarse pudo deberse a dos problemas principales, según Dworkin y col. (2006). El primero es que los medios de cultivo empleados en el laboratorio no son siempre adecuados para estimular el crecimiento de cepas naturales, ya que suelen carecer de todos los elementos nutritivos que estas bacterias encuentran en el medio natural. El segundo, que las células de estas bacterias tienden a adherirse a otras células microbianas, lo que conlleva que sus colonias aparecen mezcladas frecuentemente con otras especies diferentes. Las propias muestras poseen microorganismos que crecen formando una película sobre el agar, de manera que pueden llegar a inhibir o cubrir las colonias de *Hyphomicrobium* y *Pedomicrobium* siendo arrastradas con ellas en las resiembras sucesivas. Además, su lento desarrollo pudo hacer que tampoco alcanzaran un crecimiento considerable y quedaran enmascaradas por otros microorganismos más abundantes y de crecimiento rápido en los cultivos de enriquecimiento.

También se encontraron en las genotecas de las muestras naturales secuencias afiliadas a bacterias quimiolitotóxicas obligadas: *Nitrospira moscoviensis* (Ehrich y col., 1995), en las bacterias totales de 0212T2A y 0313T2A y en las bacterias activas de 0313T2A. La presencia de estas bacterias podría sugerir la ocurrencia de procesos de biomineralización en el túnel de Paranhos.

La presencia de precipitados ricos en Mn y Fe sobre las bacterias, observados mediante FESEM y TEM, sugirió que dichas células bacterianas inducían la

precipitación de óxidos de manganeso y hierro. Los agregados porosos nodulares embebidos en EPS, mostraron la morfología típica de los óxidos de manganeso biogénico, concretamente birnesita biogénica (Friedrich y col., 2011). Este hecho también sugiere que es posible el crecimiento de bacterias oxidantes de manganeso y hierro probablemente implicadas en la formación de los óxidos negros de ferromanganeso que recubren las paredes de granito de Paranhos.

Por otra parte, las afiliaciones filogenéticas de los clones secuenciados de los cultivos de enriquecimiento de los depósitos negros de ferromanganeso de la muestra 0212T2A mostraron un 100% de similitud con *Pseudomonas putida*, una bacteria conocida por precipitar óxidos de Mn en sus paredes celulares (Villalobos y col., 2005). Además, las EPS secretadas por los microorganismos, detectadas mediante FESEM, facilitarían la adhesión de las células microbianas a la pared granítica del túnel de Paranhos y posibilitarían su acción metabólica sobre él.

En la comunidad total y en la metabólicamente activa del cultivo de enriquecimiento negro de 0313T2A, se encontraron siete secuencias afiliadas al género *Janthinobacterium*, con similitudes entre el 96 y el 91%. Las bacterias de este género son capaces de oxidar el Mn(II). La primera vez que pudieron aislarse de una cavidad subterránea fue en el trabajo de Carmichael y col. (2013), aunque anteriormente se pudieron aislar miembros de este género en rocas del desierto (Northup y col., 2010).

La detección de actividad oxidante en la muestra 0212T2A y los cultivos de enriquecimiento mediante el estudio del gen *mofA*, evidenció la existencia de microorganismos en estos depósitos que poseían dicho gen y que por tanto podían desarrollar reacciones de oxidación del manganeso. Este gen ha sido atribuido tradicionalmente a *Leptothrix* sp., pero se piensa que existe homología entre el *mofA* y otros genes de bacterias oxidantes del manganeso (Siering y Ghiorse, 1997). La homología del gen *mofA* con otros genes podría dar señal positiva, al estar destinados a la misma función, de manera que los cebadores diseñados para la amplificación del *mofA* también amplificarían los genes homólogos. Esto explicaría la señal por parte de la bacteria *Pseudomonas putida* en la PCR llevada a cabo para la detección del gen (Figura 3.16), ya que Geszvain y col. (2013) pusieron de manifiesto que al menos posee un locus codificante de una enzima oxidasa multicobre con cierta homología con el gen *mofA*.

La diversidad filogenética de las bacterias oxidantes de manganeso en cuevas respalda aún más la importancia de este proceso para las células microbianas (Carmichael y col., 2013).

➤ Birnesita sintética y birnesita biogénica

La presencia de birnesita en las muestras también se pudo constatar con los análisis mediante FTIR, comparando su espectro con el de la birnesita sintética

obtenida en el laboratorio (Figura 3.25). Giovanoli (1969), sugirió que la birnesita ocurre en una infinidad de variedades estructurales, todas ellas basadas en la misma red cristalina, pero que difieren en el tamaño de los cristales, el orden de las vibraciones, el estado de oxidación del manganeso y la sustitución de cationes. Esta afirmación se constata al comparar el espectro de FTIR de birnesita sintética con el de birnesita natural, puesto que muestran variaciones en la posición de las bandas y, generalmente en mayor medida, con respecto a la intensidad de las mismas (Potter y Rossman, 1979). El hecho de que los espectros de absorbancia de la birnesita sintética y la biogénica de este trabajo no fueran idénticos es atribuible también a que en esta última se produce una incorporación de otros constituyentes celulares que modifican las bandas del espectro (Parikh y Chorover, 2005). Sin embargo, la similitud general de los espectros sugiere que la mayor parte de las muestras de birnesita están caracterizadas por las mismas estructuras básicas, aunque existen compuestos que marcan la excepción, mostrando bandas que se desplazan entre 20-40 cm^{-1} respecto a las de otras birnesitas, como la birnesita #54 estudiada por Potter y Rossman (1979).

La birnesita se puede distinguir de la mayor parte de los óxidos de manganeso por la presencia de dos bandas, 425 y 468 cm^{-1} , como características principales (Potter y Roosman, 1979), que permiten distinguirla de otros óxidos de manganeso como la todorokita. A pesar de ello, la similitud de estos compuestos puede provocar que sea difícil distinguir la birnesita de la todorokita poco cristalina. Estas dos bandas aparecieron en la zona esperable del espectro en las dos muestras de birnesita estudiadas, con un buen grado de cristalinidad en el caso de la birnesita sintética según indicó el pico agudo de los 425 cm^{-1} (Julien y col., 2004), por lo que el compuesto obtenido en el laboratorio fue birnesita, quedando también demostrado mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 3.24), y cuando se trató con el compuesto Leucoberbelin blue-I, generando el color azul intenso atribuible a la presencia de los óxidos de manganeso (Figura 3.12).

➤ Filamentos reticulados

Los bajos porcentajes de similitud que presentaron algunos clones, especialmente en el caso de las muestras naturales, apuntaron a la presencia de especies microbianas que aún no habían sido descritas, pudiendo alguna de ellas incluso ser responsable de los filamentos observados en estas muestras. Estos enigmáticos filamentos reticulados poseen carácter claramente orgánico, como se constató con los análisis de TEM-EDS (Figura 3.20), con una estructura filamentosa de carbono y precipitados ricos en óxidos de manganeso y hierro depositados sobre la misma.

Es importante tener en cuenta que, por la experiencia obtenida con los cultivos de enriquecimiento, los filamentos tendían a desaparecer con el paso del tiempo, debido a su escasa viabilidad. De hecho, no fue posible observar mediante

microscopía electrónica filamentos reticulados en las siembras de la muestra original realizadas tras la conservación de la misma tanto a 4°C como a -80°C. Todo apunta a que tampoco se reprodujeron en las resiembras de los cultivos, al menos en la forma reticulada. En el caso de que llegaran a reproducirse, únicamente lo harían en su forma lisa, ya que en las resiembras tampoco fue posible la detección de formas reticuladas mediante microscopía electrónica, hasta llegar a la tercera resiembra, en la que parecían perderse totalmente, puesto que se dejó de observar cualquier tipo de filamento, tanto reticulado como liso.

En la DGGE de la Figura 3.15, la desaparición de algunas bandas con las sucesivas resiembras respecto a la muestra natural (perfiles 2, 4 y 5), indicaron que ciertamente hay microorganismos que dejan de mostrarse en la comunidad del cultivo, siendo los filamentos reticulados una posibilidad. Con el paso del tiempo, en los cultivos iniciales también se observaron cada vez más filamentos aparentemente vacíos.

Debido a que la formación de vainas es una característica poco extendida en el mundo bacteriano, la estructura de los filamentos reticulados que aparecen asociados a depósitos de ferromanganeso se ha intentado atribuir anteriormente a *Leptothrix* sp. (Melim y col., 2008), debido a que algunas de las especies que conforman este género dan lugar a estructuras envainadas y, además, todas son conocidas por su habilidad para oxidar manganeso (Van Veen y col., 1978).

La escasa viabilidad de los filamentos reticulados es otro de los motivos por los que hay autores que piensan que el género *Leptothrix* está relacionado con estas estructuras inusuales. En el trabajo de Suzuki y col. (2013) se llevó a cabo el estudio de una cepa de este género que, en la etapa inicial de la formación de su vaina característica, presentaba células bacilares alineadas en el interior de la misma, pero más tarde la mayoría de ellas quedaron vacías. La observación de células degeneradas por un proceso de autólisis en el interior de la vaina, permitió a estos autores concluir que dicho proceso era una de las principales causas que provocaban el posterior vaciamiento de los filamentos de *Leptothrix* sp.

Este comportamiento recuerda en cierto modo al que se ha observado en los filamentos reticulados del presente trabajo, especialmente en los aspectos relacionados con la viabilidad y el vaciamiento de las estructuras filamentosas y la observación de células bacilares en el medio. Sin embargo, siguen sin encontrarse evidencias filogenéticas que demuestren que *Leptothrix* sp. y los enigmáticos filamentos reticulados son microorganismos relacionados entre sí.

Aunque en ningún caso se detectaron secuencias afiliadas con *Leptothrix* sp. en las muestras de depósitos negros, sí se detectó *Aquabacterium commune* en la comunidad metabólicamente activa de la muestra 0313T2A con una

similitud del 98%, perteneciente a la familia *Comamonadaceae*, la misma a la que pertenece *Leptothrix* sp. Ambas comparten la morfología filamentosa característica, pero con la diferencia de que *Aquabacterium* sp. no posee la capacidad de formar vaina ni oxidar manganeso (Manz y col., 2006). No obstante, son bacterias bacilares con flagelo, como algunas de las observadas mediante microscopía electrónica en estas muestras (Figura 3.19).

Tampoco se conoce el papel que juegan los filamentos lisos observados en las muestras de los depósitos negros de Paranhos. La observación de células mineralizadas y de filamentos con un vestigio reticular (Figura 3.22 B y C) permitiría especular con la posibilidad de que se trataran de una fase intermedia en el proceso de desarrollo o disgregación de los filamentos reticulados.

➤ **Cambio de color en los cultivos de enriquecimiento en medio Rouf modificado**

El cambio de color que se produjo en los cultivos de enriquecimiento de medio Rouf modificado (Rouf y Stokes, 1964) es un proceso que no se llegó a comprender en su totalidad. Debido a que no todos los frascos marrones con este medio de cultivo cambiaron a color negro, surgió la idea de que el proceso del cambio de color tenía que estar sujeto a la muestra que se hubiera sembrado. La presencia del portaobjetos de vidrio pareció acelerar la generación de precipitados en el medio de cultivo, pero tampoco provocó el estado negro en todas las muestras, por lo que no jugó el papel de un catalizador fundamental.

El cambio de color pudo influenciar de alguna manera a las comunidades microbianas, haciendo que el crecimiento fuera más favorable para algunas especies en lugar de otras, como quedó patente en la genoteca obtenida del cultivo de enriquecimiento de color marrón de la muestra 0313T2A, la cual mostró mayor diversidad bacteriana que la obtenida en su análogo negro, apareciendo grupos bacterianos que no se encontraron en este último, como Alphaproteobacteria, Acidobacteria y Actinobacteria. Aun así, es preciso tener en cuenta que la extracción de los ácidos nucleicos de los cultivos de enriquecimiento de distinto color no se realizó en el mismo momento, ya que fue preciso un tiempo variable para que pasaran del estado negro al marrón una vez que los frascos eran abiertos, por lo que las comunidades microbianas también pudieron haberse visto modificadas durante ese tramo temporal. Incluso las fluctuaciones en el pH del medio pudieron haber influenciado en este sentido, ya que, como se constató en el seguimiento del valor del pH de los frascos, no fue totalmente constante a lo largo del tiempo.

A pesar de todas las incógnitas generadas, sí se pudieron comprobar dos hechos que se cumplieron en todos los casos: primeramente, los frascos negros, sin excepción, revirtieron a marrones a medida que perdieron el hermetismo y, en

segundo lugar, si los frascos negros no eran abiertos en ningún momento, podían permanecer en ese estado indefinidamente, sin sufrir ningún cambio de color.

La clave para comprender este proceso puede residir en los datos del potencial redox, relacionado con el valor del oxígeno disuelto en el agua. En todas las mediciones realizadas, se obtuvieron unos valores de potencial redox positivos, tanto para los cultivos negros como para los marrones, existiendo por tanto en todos ellos un ambiente favorecedor de reacciones de oxidación, aunque un poco más en el frasco marrón al presentar valores más elevados. El menor potencial redox del frasco negro podía deberse a que los microorganismos de la muestra con la que estaban sembrados llevaron a cabo reacciones metabólicas en las que utilizaron tanto al oxígeno y al manganeso como aceptores de electrones y así obtuvieron energía mediante la respiración aerobia. La forma bivalente del manganeso (Mn^{2+}) se genera a potenciales bajos, siendo soluble en agua y fácil de incorporar por los microorganismos. Estos elementos fueron agotándose probablemente, debido a que el frasco estaba cerrado y no había más aporte de ningún componente, por lo que la concentración del oxígeno disuelto disminuyó en estas condiciones y, como consecuencia, el potencial redox también, a pesar de que el ambiente seguía siendo oxidante. Con la apertura del frasco, el oxígeno pudo penetrar de nuevo en el medio de cultivo y disolverse en él, aumentando su concentración y provocando que el potencial redox aumentara su valor. Debido a que todo el Mn ya estaría oxidado a estas alturas, el nuevo aporte de oxígeno pudo favorecer la renovación del ambiente oxidante, provocando que los microorganismos se centraran más en tomar como aceptor de electrones de la respiración microbiana tanto a este oxígeno como al Fe, resultando en una predominancia del color marrón de los óxidos de hierro sobre el negro de los óxidos de manganeso. Esta teoría se apoya en los estudios de Atlas y Bartha (1993) y en los de Lynch y Poole (1979).

Según Atlas y Bartha, (1993), el orden preferencial para la utilización de aceptores de electrones corresponde, de mayor a menor, a manganeso, oxígeno y hierro. Además, los datos del potencial redox en el frasco marrón fueron más cercanos al rango en el que se favorece la oxidación del hierro (de Fe^{3+} a Fe^{2+}), que se sitúa entre los 0,2 y 0,3 V (Lynch y Poole, 1979; Atlas y Bartha, 1993). Por otra parte, la oxidación del hierro a pH neutro es muy lenta a pesar de la existencia un potencial ligeramente positivo, por lo que una vez que el pH del medio aumentó, según los datos recogidos en las mediciones tomadas, pudo haberse favorecido que se produjera con una mayor rapidez esta oxidación.

Los microorganismos implicados en el proceso del cambio de color de los cultivos de enriquecimiento podrían ser bacterias detectadas en estas muestras como *Pseudomonas putida*, *Hyphomicrobium* sp. y *Pedomicrobium* sp., debido a su capacidad de precipitar óxidos de manganeso.

➤ ***Leptothrix cholodnii* LMG 8142**

La cepa *Leptothrix cholodnii* LMG 8142, mostró colonias de aspecto muy similar a las obtenidas en las bacterias aisladas de este trabajo, de color marrón oscuro. A pesar de ello, en los cultivos de enriquecimiento en medio Rouf modificado en los que se sembró no se originó ningún cambio a color negro.

Esta cepa mostró problemas para ser reconstituida tras el envío por parte de la colección de cultivo belga y también problemas de contaminación, siguiendo la estela de la dificultad existente en el aislamiento de las cepas de este género y de la pérdida de sus características (Spring y Kampfer, 2006). Por si fuera poco, muchas de las cepas de esta especie tienen una fuerte tendencia a disociarse espontáneamente, originando colonias lisas en lugar de las típicas rugosas. Estos mutantes pueden perder la capacidad de generar vaina e incluso de oxidar el manganeso (Spring y Kampfer, 2006). Es posible que la cepa de la colección ya presentara estos problemas y por ello no pudieran observarse depósitos negros en los cultivos de enriquecimiento, puesto que aunque su capacidad de oxidar el manganeso no hubiera desaparecido totalmente, ya que el análisis del gen *mofA* sí dio resultado positivo, pudo haberse mermado lo suficiente como para no generar un color apreciable. Esto también sugeriría que el cambio de color observado en los cultivos de enriquecimiento se produjo por la acción de un conjunto de microorganismos y no únicamente una cepa.

Además, *Leptothrix cholodnii* LMG 8142 mostró más de una banda en la DGGE (Figura 3.15), circunstancia que a veces puede acontecer en algunas cepas (Zijnga y col., 2006). Se trató de una dificultad añadida a la hora de poder extraer conclusiones sobre si existía la posibilidad de que *Leptothrix* sp. se encontrara en las muestras en estudio. La coincidencia de alguna de sus bandas con las de las muestras de depósitos negros del túnel de Paranhos permitió no descartar totalmente esa teoría.

➤ **Reactivo Leucoberbelin blue-I**

La aplicación del reactivo Leucoberbelin blue-I sobre las muestras de depósitos de ferromanganeso del túnel de Paranhos no aportó resultados concluyentes.

El efecto de este reactivo se comprobó con la realización de una DGGE tras su aplicación en las distintas muestras. Sobre el cultivo de enriquecimiento de 0212T2A sí pareció haber tenido efecto, ya que aparecieron nuevas bandas respecto al patrón del cultivo sin el reactivo aplicado, pero no en el caso de la muestra 0313T2A (Figura 3.15). Sin embargo, es preciso tener también en cuenta que pudo no haber tenido influencia alguna en la aparición esas nuevas bandas, ya que el Leucoberbelin

blue-I se aplicó un tiempo más tarde respecto al momento en el que se extrajo el ADN inicial de la muestra.

Además, mediante FESEM se constató que el compuesto no había disuelto los MnO_2 , al seguir mostrando su estructura característica, y que también afectaba de alguna manera a los microorganismos de la muestra, ya que disminuía su número considerablemente.

La teórica destrucción de células y la falta de disolución de los MnO_2 generó dudas sobre la utilidad del reactivo Leucoberbelin blue-I, por lo que, a pesar de que con la birnesita sintética sí mostró una reacción positiva apreciable (Figura 3.12), se decidió descartar su aplicación en el resto de las muestras de la tesis.

3.4.2 MUESTRA DE MOONMILK 0710T2-6F

➤ Comunidades microbianas y su relación con el posible origen biogénico del moonmilk

En lo que respecta a la muestra de moonmilk 0710T2-6F, para evaluar la diversidad microbiana, se determinaron las relaciones filogenéticas de las secuencias obtenidas del gen de ARNr 16S y de la región ITS, obteniéndose tres genotecas en total. Al igual que en el caso de las muestras de depósitos negros, se generaron un número considerable de OTUs representando únicamente una secuencia de todo el conjunto de datos (denominados en inglés “singletons”), pero se decidió no eliminarlos para evitar el riesgo de descartar filotipos presentes a muy bajas abundancias (Lie y col., 2014).

La mayor parte de los clones bacterianos analizados correspondieron a Actinobacteria, filo frecuentemente identificado en numerosas cuevas (Northup y col., 2003; Groth y Saiz-Jimenez, 1999; Laiz y col., 1999). Cañaveras y col. (2006) demostraron que las actinobacteria participan en la formación del moonmilk. También son importantes en los procesos de degradación de materia orgánica (Laiz y col., 2000). La identificación de un gran número de este tipo de bacterias en la muestra de moonmilk del túnel de Paranhos sugiere que podría existir una relación estrecha entre esta clase de espeleotema y la comunidad de actinobacterias, lo que apunta a su proceso de formación.

Pseudonocardia fue el género predominante con la especie representativa *Pseudonocardia hispaniensis*, cuya cepa con mayor similitud procede de una planta de tratamiento de aguas residuales industriales en España (Cuesta y col., 2013). A pesar de que Paranhos es un túnel artificial, hay evidencias de que sus condiciones ambientales han de ser similares a las de otras cuevas en las que las especies del filo Actinobacteria pueden desarrollarse sin problemas.

Las fuentes de aislamiento de las actinobacterias de la muestra 0710T2-6F mostraron similitudes con el túnel de Paranhos, ya que existió una amplia variedad de ambientes subterráneos como los tubos de lava de Azores (Portugal), al igual que se comprobó en las muestras de los depósitos negros de ferromanganeso, suelos minerales y de la rizosfera e incluso superficies de las rocas y los espeleotemas de las Cuevas Kartchner (EE.UU.).

El filo Proteobacteria también estuvo muy representado en la muestra de moonmilk de Paranhos, con más del 40% de las bacterias obtenidas afiliadas a él. Engel y col. (2013) llevaron a cabo el estudio de los extensos depósitos de moonmilk existentes en dos cuevas italianas, Grotta della Foos y Bus della Genziana, revelando que la mayor parte de los clones de sus muestras de moonmilk también pertenecían al filo Proteobacteria. Engel y col. (2013) sugirieron además la existencia de una serie de características compartidas entre las comunidades microbianas de los espeleotemas de tipo moonmilk, incluso aunque estos se encuentren en localizaciones separadas geográficamente, siendo posible detectar algunos grupos microbianos comunes entre ellos, como ocurre en este caso con las proteobacterias. Sin embargo, en las muestras estudiadas por estos autores, el número de clones afiliados a Actinobacteria fue bajo comparado con los resultados obtenidos en el moonmilk del túnel de Paranhos. Esto está en consonancia con el hecho de que el término moonmilk no engloba una definición mineralógica única, sino que sólo hace referencia al aspecto de estos espeleotemas (Curry y col., 2009).

La mayor parte de las bacterias dentro del filo de Proteobacteria en la muestra de moonmilk estuvieron afiliadas a la clase Alphaproteobacteria. Los géneros *Hyphomicrobium* y *Pedomicrobium* volvieron a estar presentes, al igual que en las muestras de depósitos negros de ferromanganeso del túnel de Paranhos estudiadas en este trabajo y en el de Miller y col. (2012b). Además, se hallaron bacterias no cultivadas, aisladas de biofilms en las rocas de minas, en tubos de lava y en la Cueva Pajsarjeva (Eslovenia), e incluso procedentes de muestras de agua de las cuevas calizas en Carlsbad (EE.UU.). El moonmilk es un espeleotema común en cuevas kársticas, por lo que no resulta extraño que bacterias de estos ambientes puedan hallarse también en esta clase de espeleotema.

Entre las gammaproteobacterias (14%), los clones pertenecieron en su mayoría al orden Xantomonadales, representado por los géneros *Pseudofulvimonas* y *Panacagrimonas*. *Panacagrimonas perspica* se aisló inicialmente del suelo de un campo de ginseng (Im y col., 2010).

Con respecto a la clase Deltaproteobacteria y los filos Acidobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes, se detectaron pocos clones en la muestra de moonmilk de Paranhos. Aunque anteriormente Acidobacteria y Firmicutes han sido identificados abundantemente en cuevas (Chelius y Moore, 2004), como ocurre en los clones de las

muestras naturales de los depósitos negros de ferromanganeso estudiados, la razón por la que poseían una baja presencia en la muestra de moonmilk de Paranhos es desconocida.

En cuanto a la presencia del dominio Archaea en la muestra de moonmilk, Thaumarchaeota fue el único filo identificado (77%), correspondiendo el resto a arqueas sin clasificar (23%). La presencia de arqueas no descritas convierte al moonmilk en una interesante fuente de aislamiento de nuevas especies de este tipo de microorganismos. El análisis de la estratificación desarrollado por Reitschuler y col. (2014), mostró que las arqueas en el moonmilk estaban divididas generalmente en una parte aeróbica/microaerófila, con Thaumarchaeota presente cerca de las capas superficiales, y una parte anaeróbica más profunda, con arqueas de afiliación incierta hasta ahora. Estos datos estuvieron en consonancia con el estudio de la muestra de moonmilk del túnel de Paranhos, debido a que se detectaron tanto Thaumarchaeota como arqueas sin clasificar. La disminución de los niveles de oxígeno en zonas más profundas sería asumible, teniendo en cuenta el espesor del moonmilk, la abundancia de los microorganismos y sus actividades metabólicas relacionadas (Stewart y Franklin, 2008).

Además, entre las fuentes de aislamiento de los clones de arqueas no cultivadas de la muestra de moonmilk, se pudieron encontrar agua carbonatada de un manantial, depósitos de ferromanganeso y aguas subterráneas, todos ellos de características similares al túnel de Paranhos (Tabla 3.13). De hecho, entre las arqueas no clasificadas fue posible hallar una procedente de Paranhos también, en otro tipo de depósitos de la pared granítica (Tabla 3.13).

Las afiliaciones filogenéticas de los OTUs obtenidos de las comunidades de microorganismos eucariotas de la muestra de moonmilk 0710T2-6F, pertenecieron principalmente al filo Ascomycota. Muchos de estos clones tienen como identificación molecular más cercana un hongo no cultivado, con dificultad en la asignación de una especie concreta (Tabla 3.14). Algunos de ellos provenían de fuentes de aislamiento relacionadas con ambientes subterráneos, especialmente aquellos procedentes de la Cueva de Lascaux en Francia: clon de *Verticillium* no cultivado y clon de *Gymnascella* no cultivado. Además, también se encontró *Cladosporium* sp. en el moonmilk estudiado por Rooney y col. (2010), al igual que en un clon no cultivado de este estudio (Tabla 3.14).

Debido a las características similares entre las fibras de calcita con forma de aguja (needle fibre calcite, NFC) y los filamentos fúngicos (como las hifas y los rizomorfos), se ha propuesto un origen fúngico para estos NFC (Verrechia y Verrechia, 1994). Se trata de una hipótesis realista, teniendo en cuenta sus ambientes compatibles, su similitud en dimensiones y, probablemente lo más importante, las capacidades metabólicas de los hongos respecto al calcio, ya que podrían estar

implicados en la génesis de la calcita (Bindschedler y col., 2012). Concretamente, dentro de Ascomycota y Basidiomycota, existen hongos con septos en las hifas que pueden dar lugar a NFC, mediante la liberación de estas fibras al deteriorarse las hifas del hongo (Bindschedler y col., 2012). Teniendo en cuenta que se hallaron hongos de estos filos en la muestra de moonmilk de Paranhos, la implicación de los mismos en la formación del moonmilk sería factible.

Contrariamente, Cañaveras y col. (2006) no detectaron hongos en los estudios moleculares llevados a cabo en el moonmilk de la Cueva de Altamira. Tampoco estuvieron presentes en los microorganismos aislados, de manera que únicamente pudieron obtener bacterias, al igual que en otro estudio de los mismos autores (Cañaveras y col., 1999). Considerando que tanto la morfología de las fibras que observaron como su diámetro (0,1–0,2 μm) se correspondían en mayor grado con la estructura de las actinobacterias que con la de las hifas fúngicas (Cañaveras y col., 1999; Wilkinson, 2003), estos autores sugirieron que los hongos no intervienen en el origen del moonmilk.

➤ **Composición de las muestras y origen de la posible fuente de calcio**

La naturaleza de la muestra de moonmilk quedó demostrada mediante los análisis por FESEM, recalcándose la clara presencia de las agujas NFC ricas en calcio de este compuesto (Figura 3.29).

No hay que olvidar que Paranhos no es un túnel kárstico, por lo que es preciso cuestionarse cuál es la fuente de calcio en este ambiente. Las diversas conexiones de este túnel con el exterior, sumado a su poca profundidad y la presencia en la superficie de vegetación, ácidos orgánicos y actividades humanas, provocan que el agua de infiltración introduzca en él una gran variedad de componentes. Estas aguas podrían disolver materiales de naturaleza carbonatada, tales como hormigones, morteros y otros componentes empleados en las construcciones urbanas. Es preciso resaltar también la existencia de cementos debida a las intervenciones de rehabilitación realizadas en el interior de la cavidad a lo largo de los años. Sería factible que estos carbonatos se incorporaran a las aguas meteóricas que se infiltran en el interior del túnel de Paranhos y provocaran una supersaturación de la calcita, con la subsecuente precipitación, dando lugar a depósitos de minerales secundarios como el moonmilk. Las actividades metabólicas de las bacterias podrían influir también en esta deposición mineral, desencadenando ciertos cambios en la composición química del medio (Onac, 2012).

De hecho, Pedersen (1997) puso de manifiesto que ciertas fracturas en las rocas madres graníticas pueden ser ocupadas por minerales precipitados, estando la calcita entre ellos. Esto explicaría por qué el moonmilk se localizó sólo en ciertos

puntos en el túnel de Paranhos, ya que su presencia estaría sujeta al recorrido del agua de infiltración transportando carbonatos hacia el interior del túnel.

El goteo del agua que entra en el túnel también puede generar una inoculación constante de microorganismos. Todos estos procesos podrían estar envueltos en el desarrollo microbiano dentro del túnel de Paranhos y, a su vez, conectados con los depósitos de moonmilk.

CAPÍTULO 4

MINA DE AGUA DAS AVELEIRAS (BRAGA, PORTUGAL)

4.1 LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LA MINA DE AGUA DAS AVELEIRAS

En los últimos años se están desarrollando iniciativas destinadas a la conservación y revalorización del patrimonio geológico, especialmente en aquellos puntos de interés científico, educativo o turístico, denominados geositos (“geosites” en inglés) (Reynard, 2003). Los geositos pueden incluso poseer importancia para la historia de una determinada región. Por estos motivos, se encuentra en auge la geoconservación, disciplina dedicada a preservar la geodiversidad y patrimonio geológicos (Gray, 2004). Esta es una línea de investigación amplia y emergente que busca la adopción de medidas que favorezcan tanto la recuperación de una zona concreta como contribuir a su sostenibilidad ambiental, a la vez que proporciona un valor añadido del que la sociedad se pueda beneficiar (Brocx y Semeniuk, 2007).

En Portugal, la legislación referente a la geoconservación es bastante reciente, ya que hasta 2008 no se creó la Ley de Naturaleza, Conservación y Biodiversidad (Brilha, 2009). Sin embargo, a pesar del poco tiempo que se lleva avanzando en este campo, ya se pueden encontrar grandes ejemplos de iniciativas desarrolladas con éxito en el país, como demuestran los geoparques de Naturtejo (Castelo Branco) y Arouca (Aveiro).

Dicho abordaje es una clara necesidad sobre localizaciones que poseen un gran valor potencial, pero que por desgracia, actualmente presentan un estado de conservación muy deficiente. Un caso que encaja en esta descripción se puede encontrar en el municipio de Mire de Tibães, situado en el noroeste de Portugal, en las inmediaciones de la ciudad de Braga, franqueada por los macizos graníticos de Gondizalves, Braga, y Aveleda. La zona posee una gran riqueza patrimonial, tanto cultural como geominera. Alberga el Monasterio de San Martín de Tibães, fundado a finales del siglo XI, el cual llegó a poseer una gran importancia a nivel nacional al ser proclamado Casa Madre de la Congregación Benedictina portuguesa. Tras su apogeo, continuó un periodo de decadencia que culminó con su compra por parte del Estado portugués. Se encuentra clasificado como Inmueble de Interés Público desde 1944 y como Patrimonio del Estado Portugués desde 1986, a pesar del avanzado estado de degradación en el que se encontraba debido a un incendio que lo destruyó parcialmente en el siglo XIX. Desde ese momento comenzó su protección patrimonial, que sigue realizándose a día de hoy (Dias Costa, 2002).

Para poder suplir de agua al Monasterio durante los siglos de actividad, fue imprescindible contar con una infraestructura de minas de agua, abandonadas actualmente (Coelho Dias, 2010; Lopes, 2012), entre las que se encuentran la “Mina do Moinho de Água”, la “Mina da Cabrita”, la “Mina da Preguiça” y la “Mina de San Bento”, entre otras (Lopes y col., 2008). La amplia red de minas de agua construidas estaba constituida generalmente por galerías de pequeñas dimensiones, bajas y estrechas, con la excepción de la “Mina das Aveliras” (siglo XVII), la cual posee seis

pequeñas galerías transversales y dos galerías principales de mayores dimensiones, sin luz natural y con un flujo de agua importante. Esta mina, construida por los frailes Benedictinos de Tibães (Oliveira, 1974; Mata, 2002), se encuentra situada en la ladera norte del monte de S. Filipe (anteriormente denominado S. Gens; Fontes, 2005), abarcando parte de los terrenos del Monasterio de Tibães y prolongándose hacia una zona más elevada del monte (Figura 4.1 A y B).

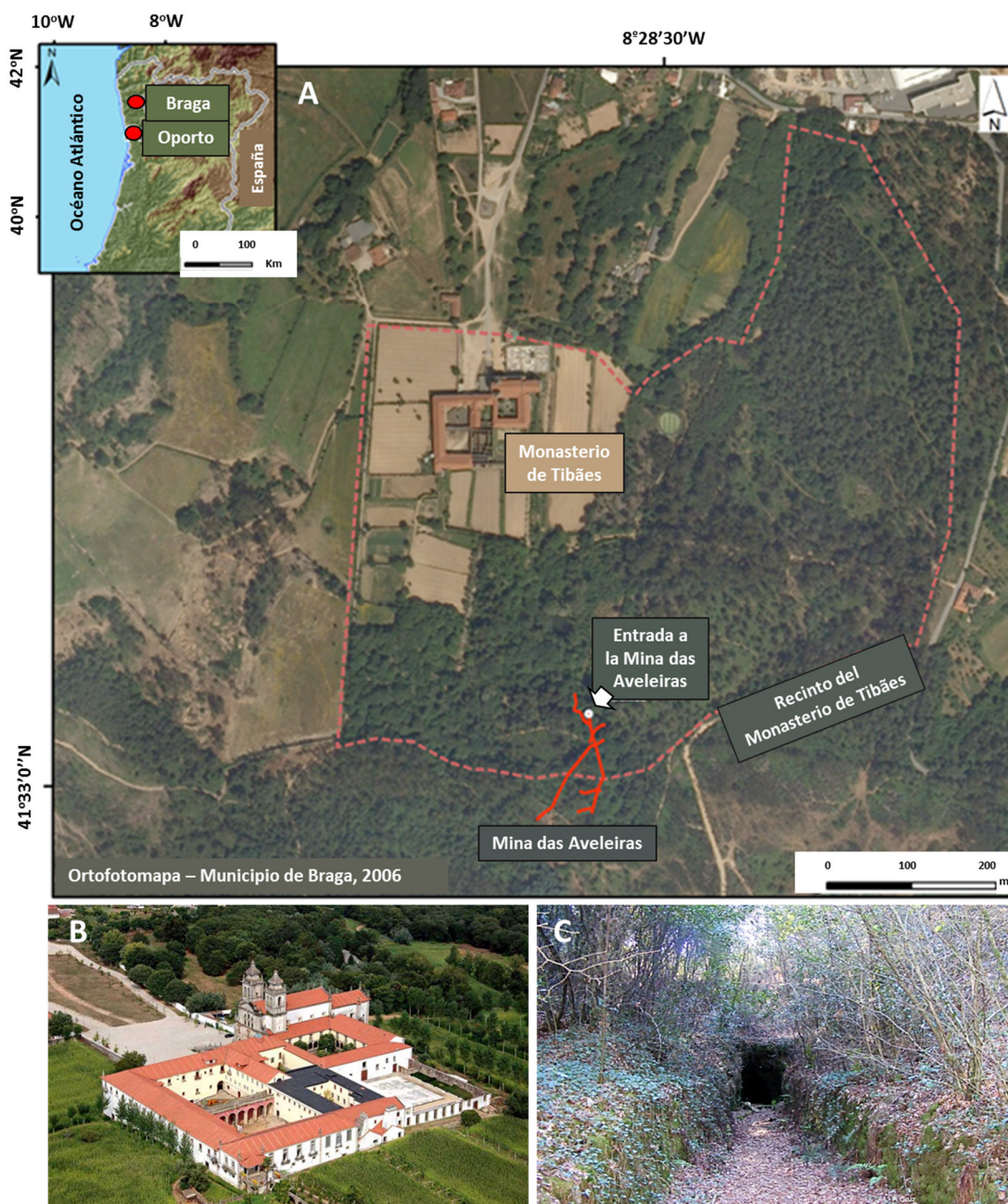


Figura 4.1 A. Vista aérea del recinto del Monasterio de Tibães y la ruta subterránea de la Mina das Aveleiras. B. Monasterio de Tibães. C. Entrada a la Mina das Aveleiras.

La Mina das Aveleiras está excavada principalmente en rocas metasedimentarias (esquistos micáceos, ricos en arcillas con intercalaciones finas de segregaciones de cuarzo, filitas con cuarzo, así como corneanas de mica y cuarzo) y en

menor grado en granito de grano fino y medio; ambos macizos de rocas fracturadas están entrecruzados con vetas de cuarzo enriquecidas en wolframita con un contenido menor de sulfuros (Lopes, 2012). Esta mina de agua sufrió una reconversión a mina de wolframio entre los años 1940 y 1962, al poseer riqueza en este metal, por el que acudían muchos buscadores de minerales debido a los precios excepcionales que alcanzó en el periodo de la Segunda Mundial (Vilar, 1998). El enorme volumen de trabajo que se llevó a cabo para su extracción condujeron, prácticamente, al agotamiento del depósito mineral (Lopes y col., 2008).

La Mina posee una entrada principal con unas dimensiones de 1,8 m de anchura por 2,4 m de altura (Figura 4.1 C), además de otra de menores dimensiones, con unos 0,7 m de anchura. La galería principal es muy amplia, con 80 m de largo y 1,5 m de ancho, con una altura media de 1,9 m. La longitud total de las galerías es de 362,91 m. Durante la época de explotación del wolframio, las paredes y el techo de la mina fueron entibados con vigas de madera, actualmente en muy mal estado e incluso ausentes (Figura 4.2 A y B) como consecuencia de la humedad de la mina y la falta de labores de conservación, además de haberse producido el colapso del techo en algunos tramos (Figura 4.2 C).



Figura 4.2 Interior de la Mina das Azeleiras mostrando el estado de degradación de la misma. A. y B. Tablones de madera en mal estado. C. Galería con rocas desprendidas. Fuente: adaptado de Trigo y col. (2012).

La Mina de agua das Azeleiras, también conocida como Mina de Tibães, está considerada como un geosítio, por poseer un importante valor patrimonial, cultural y geominero, y en el punto de mira de iniciativas para fomentar las actividades de extensión cultural y científica. El objetivo principal que se pretende conseguir en un futuro cercano es el de llevar a cabo una reapertura de la misma en forma de museo geominero, ofreciendo visitas a la misma y creando un nuevo motivo de interés, uno de los abordajes más llamativos que ofrece la geoconservación. Por todo ello, es preciso conocer la estabilidad que posee la mina y también reforzar las galerías principales (Trigo y col., 2013).

La antigüedad de la mina, el abandono de su exploración y su aislamiento en las últimas décadas, junto a una serie de factores ambientales favorables, han llevado a que las galerías de la mina constituyan hoy en día un importante hábitat donde

proliferan algunas especies animales, principalmente de anfibios, insectos y mamíferos, que deberían ser preservadas en términos de biodiversidad (Gonçalves y col., 2000; Lopes y col., 2008). Además, esta zona está ubicada en una región densamente poblada, que se caracteriza por agricultura intensiva a pequeña escala y donde las masas forestales predominantes constan de pinos y eucaliptos. Por todo ello, la zona está dotada de una riqueza considerable, con alto interés desde el punto de vista de conservación de la naturaleza e incluso para llevar a cabo acciones de educación ambiental (Trigo y col., 2013).

Debido a su actual estado de decadencia, se están llevando a cabo diversos estudios, como análisis cartográficos, geológicos, geotécnicos, mineros, investigaciones geomecánicas y dimensionamientos, incluyendo la construcción de una nueva estructura de refuerzo (Trigo y col., 2013), con el objetivo de lograr un nuevo espacio geomuseológico y la perspectiva de un segundo ciclo de vida sostenible.

Por otra parte, la Mina das Aveleiras posee además un valor científico notable por la gran cantidad de formaciones minerales halladas en su interior, como depósitos negros, mucolitos y depósitos verdeazulados, que pueden estar asociadas con comunidades microbianas. La formación de estos espeleotemas está inducida potencialmente por microorganismos capaces de promover la biotransformación mineral y los procesos de biomineralización (Miller y col., 2014a).

4.2 LOCALIZACIÓN Y RECOGIDA DE MUESTRAS

La campaña de muestreo en la Mina das Aveleiras se desarrolló en junio de 2010. Se localizaron unos depósitos negros concentrados a lo largo de las fracturas en la roca por las que se filtraba el agua subterránea, consistentes en costras blandas y húmedas, con poca resistencia a la retirada del lecho rocoso. Estaban constituidos por material de color marrón oscuro y negro, conteniendo ocasionalmente en su superficie partículas translúcidas cristalinas y otras de color rojo anaranjado.

En una de las galerías transversales de la mina (Figura 4.3 A), se recogieron muestras por triplicado de estos depósitos negros, presentes en las paredes y el techo rocoso (Figura 4.3 B), desprendiéndolos con suavidad y traspasándolos a continuación a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL estériles (Figura 4.3 C). Las muestras, denominadas 0710BR-6F, fueron mantenidas en hielo y trasladadas inmediatamente al laboratorio para su procesamiento.

La metodología aplicada en el muestreo se centró en minimizar cualquier tipo de impacto sobre el ambiente subterráneo de la mina.

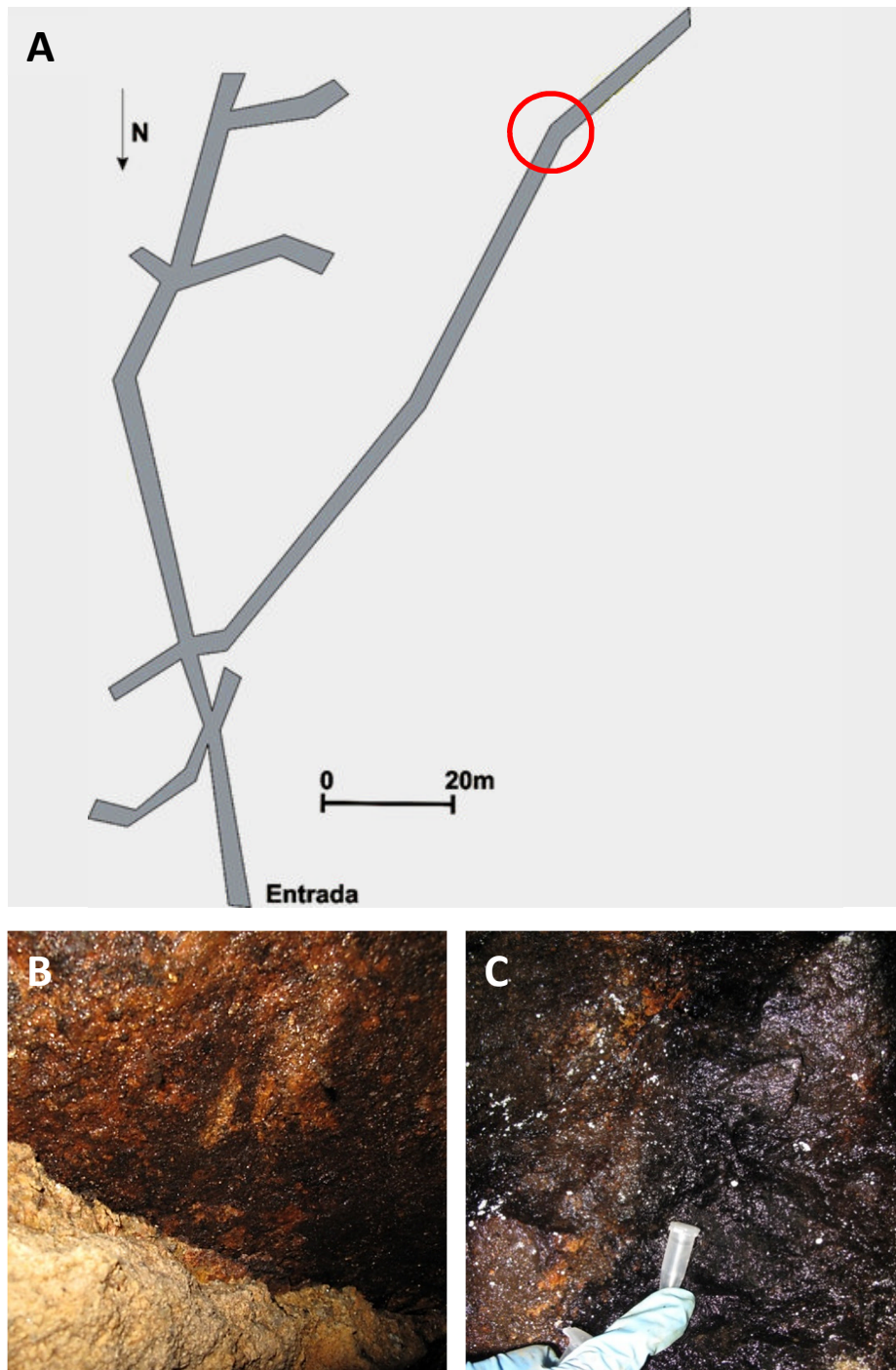


Figura 4.3 A. Mapa de la Mina das Aveleiras, con el punto de muestreo señalado con una circunferencia roja. B. Muro de granito de la Mina das Aveleiras cubierto de depósitos negros. C. Detalle de los depósitos negros, a punto de ser recogidos en tubos estériles.

Con el objetivo de identificar las especies bacterianas presentes en los depósitos negros que recubren las paredes de la Mina das Aveleiras y evaluar el posible origen biogénico de estos espeleotemas ricos en manganeso, se llevaron a cabo técnicas de biología molecular y una caracterización morfológica y mineralógica.

Por una parte, se estudió la comunidad total de bacterias presentes mediante el análisis de secuencias del gen ARNr 16S. También se analizaron las relaciones filogenéticas establecidas entre ciertas cepas de las genotecas de los depósitos negros y las cepas de referencia de especies homólogas.

Por otra parte, se realizaron análisis FESEM para una evaluación precisa de la topografía de la superficie y la morfología de estos espeleotemas, así como para detectar microorganismos y reconocer interacciones microbio-mineral.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE LA MUESTRA NATURAL DE DEPÓSITOS NEGROS MEDIANTE LA CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA DE ADN

Se obtuvieron un total de 81 secuencias libres de quimeras de la muestra natural de depósitos negros de la mina de agua, con las que se construyó una genoteca de ADN para detectar las bacterias totales presentes en la muestra de depósitos negros objeto de estudio.

La distribución de los diferentes filos en las muestras puede observarse en la Figura 4.4. El filo Proteobacteria fue el más abundante, abarcando más de la mitad de las secuencias obtenidas (51%), distribuido en las clases Alpha-, Beta-, Gamma- y Deltaproteobacteria.

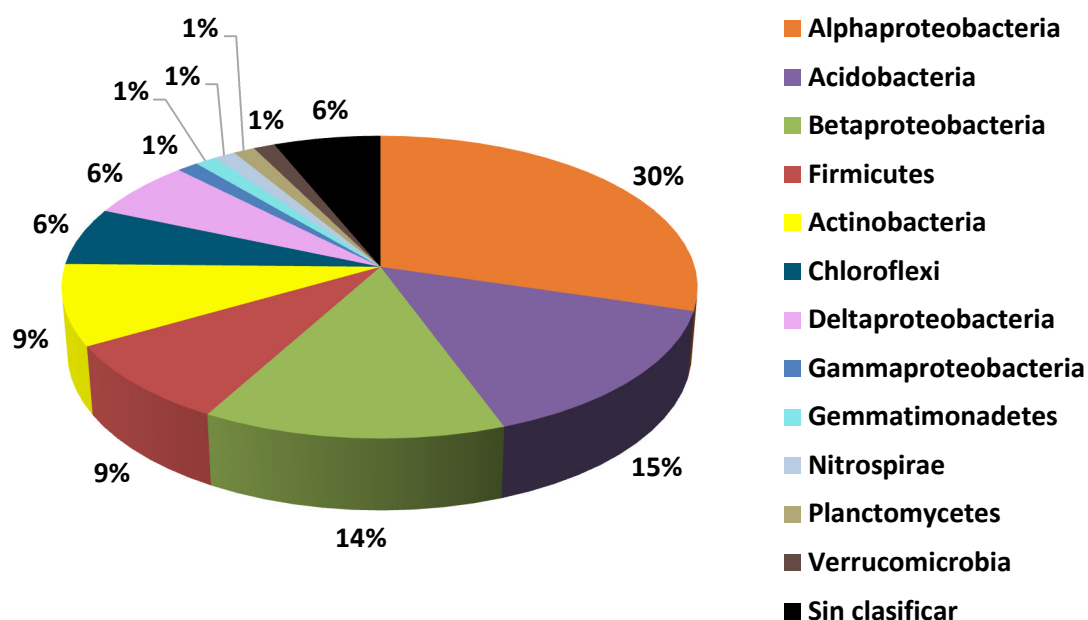


Figura 4.4 Distribución de filos en las muestras de depósitos negros de la Mina das Aveleiras, correspondiente a la genoteca de ADN de 0710BR-6F.

La clase mayoritaria fue Alphaproteobacteria (30%) seguida del filo Acidobacteria (15%). La clase Betaproteobacteria (14%) ocupó la tercera posición en términos de abundancia.

Los filos Actinobacteria y Firmicutes estuvieron bien representados, con un 9% cada uno. Con un porcentaje algo menor, 6% para cada grupo taxonómico, se detectaron también el filo Chloroflexi y la clase Deltaproteobacteria.

A su vez se identificaron otros grupos taxonómicos con bajos porcentajes, correspondientes a Gammaproteobacteria, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, Planctomycetes y Verrucomicrobia, representados con solamente un 1% cada uno. Además, hubo un 6% de bacterias sin clasificación, ya que su similitud fue menor del 80% (Eztaxon), lo que no permitió su afiliación.

Las identificaciones de las 81 secuencias obtenidas de la muestra 0710BR-6F aparecen en la Tabla 4.1, quedando distribuidas en 76 OTUs.

La clase Alphaproteobacteria (30%) estuvo representada principalmente por *Methylocapsa aurea* seguida por especies del género *Pedomicrobium*. Otras secuencias presentaron un porcentaje de similitud por debajo del 97%, lo que impide su adscripción a una especie, aunque algunas de ellas bien pudieran corresponder a especie nuevas de los géneros *Rhodoplanes*, *Hyphomicrobium*, *Pseudolabrys* y *Beijerinckia*.

Acidobacteria fue el segundo filo más abundante (15%), aunque las secuencias correspondieron a especies no cultivadas.

Dentro de la clase Betaproteobacteria solamente se identificó una secuencia correspondiente a *Polaromonas jejuensis*.

El filo Firmicutes abarcó a una amplia variedad de especies, entre las que las posibles identificaciones correspondieron a los géneros *Bacillus*, *Pelosinus* y *Paenibacillus*. Por su parte, en el filo Actinobacteria únicamente una secuencia se mostró incluida en el género *Pseudonocardia*.

Por último, dos secuencias con porcentajes de similitud del 95% correspondieron al género *Nevskia* en Gammaproteobacteria, y *Nitrospira* en Nitrospirae.

Las secuencias de otros filos y clases presentaron porcentajes de similitud muy bajos, que únicamente permitieron una clasificación como bacterias no cultivadas.

Además, las secuencias obtenidas de las muestras naturales de los depósitos negros de la Mina das Aveliras y sus identificaciones se analizaron según su procedencia, atendiendo a los datos del NCBI (Tabla 4.1).

Casi la mitad de las bacterias detectadas (43,2%) mostraron similitud con bacterias procedentes de biofilms en paredes de diversos tubos de lava del archipiélago de Azores (Portugal), siendo por tanto la procedencia más frecuente en esta muestra.

Otras fuentes de aislamiento fueron: diferentes tipos de minas (potasio, cobre, arsénico, uranio y oro) (8,6%), depósitos en pared de granito en el túnel del Manantial de Paranhos (Oporto, Portugal) (2,5%) y sedimentos recogidos en la Cueva Roraima Sur (Venezuela) (1,2%).

Un 34,6% del total correspondió a bacterias procedentes de suelos, sedimentos, rocas y ambientes naturales, como bosques, humedales y praderas.

Finalmente, el 9,9% restante correspondió a diversas procedencias menos representadas o sin especificar (Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias totales obtenidas de la muestra 0710BR-6F (81 secuencias, 76 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Alphaproteobacteria						
0710BR-G7	2	Bacteria no cultivada (JN607014)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Methylocapsa aurea</i> (FN433469)	97
0710BR-D2	2	Bacteria no cultivada (JN615713)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Dongia mobilis</i> (FJ455532)	92
0710BR-H1	1	Bacteria no cultivada (FJ479591)	Pradera	98	<i>Rhodoplanes roseus</i> (D25313)	95
0710BR-G1	1	Bacteria no cultivada (KC352351)	Aguas residuales	92	<i>Nisaea denitrificans</i> (AUFM01000008)	87
0710BR-F11	1	Bacteria no cultivada (KC352351)	Aguas residuales	99	<i>Aquaspirillum polymorphum</i> (AB000481)	91
0710BR-H3	1	Bacteria no cultivada (HM445216)	Biofilm en tubo de lava	91	<i>Dongia mobilis</i> (FJ455532)	88
0710BR-F9	1	Bacteria no cultivada (JF265782)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Methylocapsa aurea</i> (FN433469)	96
0710BR-F4	1	Bacteria no cultivada (GU257846)	Biofilm en membrana	88	<i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i> (AF235089)	87
0710BR-C9-2	1	Bacteria no cultivada (JF266138)	Biofilm en tubo de lava	95	<i>Methylocapsa aurea</i> (FN433469)	96
0710BR-D6	1	Alphaproteobacteria no cultivada (CU918797)	Digestor anaeróbico	96	<i>Pseudolabrys taiwanensis</i> (DQ062742)	95
0710BR-H2	1	Bacteria no cultivada (JF265849)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Methylocapsa aurea</i> (FN433469)	98
0710BR-H12	1	Bacteria no cultivada (HM445138)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Pedomicrobium manganicum</i> (X97691)	98
0710BR-H10	1	Bacteria no cultivada (JN615713)	Biofilm en tubo de lava	91	<i>Dongia mobilis</i> (FJ455532)	81
0710BR-B3	1	Bacteria no cultivada (JF265838)	Biofilm en tubo de lava	88	<i>Methylocapsa aurea</i> (FN433469)	85
0710BR-E10	1	Bacteria no cultivada (JN616131)	Mucolito en tubo de lava	94	<i>Pedomicrobium australicum</i> (X97693)	97
0710BR-B11	1	Bacteria no cultivada (HQ697403)	Carbón activo	98	<i>Rhodoplanes roseus</i> (D25313)	96
0710BR-B8	1	Bacteria no cultivada (HM445138)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Pedomicrobium manganicum</i> (X97691)	96
0710BR-B5	1	Alphaproteobacteria no cultivada (JN003139)	Dunita serpentinizada	95	<i>Dongia rigui</i> (HQ436504)	86
0710BR-C1	1	Bacteria no cultivada (JN615713)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Dongia mobilis</i> (FJ455532)	90
0710BR-A3	1	Alphaproteobacteria no cultivada (JF833607)	Suelo de mina de potasio	99	<i>Stella humosa</i> (AJ535710)	90
0710BR-C7	1	Bacteria no cultivada (GQ397055)	Suelo	96	<i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i> (AF235089)	95
0710BR-C5	1	Alphaproteobacteria no cultivada (HE614850)	Mina de arsénico y oro	95	<i>Beijerinckia derxii subsp. derxii</i> (AJ563933)	95

Capítulo 4

Acidobacteria

0710BR-F10	1	Bacteria no cultivada (JF266302)	Biofilm en tubo de lava	98	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	82
0710BR-G6	1	Bacteria no cultivada (JF266202)	Biofilm en tubo de lava	96	<i>Pyrinomonas methylaliphato</i> genes (AM749787)	83
0710BR-F5	1	Bacteria no cultivada (JF265789)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Pyrinomonas methylaliphato</i> genes (AM749787)	85
0710BR-B9-2	1	Bacteria no cultivada (KJ407952)	Suelo forestal	90	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> (CP000473)	87
0710BR-H6	1	Bacteria no cultivada (EU335224)	Agregados del suelo	94	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> (CP000473)	88
0710BR-H11	1	Bacteria no cultivada (JF266221)	Biofilm en tubo de lava	94	<i>Bryobacter aggregatus</i> (AM162405)	80
0710BR-E8	1	Bacteria no cultivada (JF265827)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Acidobacterium capsulatum</i> (CP001472)	82
0710BR-B12	1	Bacteria no cultivada (AJ617855)	Suelo	96	Candidatus <i>Solibacter usitatus</i> (CP000473)	92
0710BR-A2	1	Bacteria no cultivada (JF266221)	Biofilm en tubo de lava	96	<i>Bryobacter aggregatus</i> (AM162405)	81
0710BR-A1	1	<i>Acidobacteriaceae</i> no cultivado (AM159293)	Rizosfera de arrozal	91	<i>Geothrix fermentans</i> (AUAU01000012)	90
0710BR-E5	1	Bacteria no cultivada (JF266221)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Bryobacter aggregatus</i> (AM162405)	81
0710BR-C11	1	Bacteria no cultivada (JF265789)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Pyrinomonas methylaliphato</i> genes (AM749787)	85
Betaproteobacteria						
0710BR-B7	2	Betaproteobacteria no cultivada (JF833754)	Suelo de mina de potasio	98	<i>Ottowia pentelensis</i> (EU518930)	89
0710BR-G5	1	Bacteria no cultivada (JQ738786)	Cráter en roca basáltica	95	<i>Cupriavidus gilardii</i> (EU024163)	88
0710BR-F8	1	Bacteria no cultivada (HQ664194)	Sedimento contaminado con arsénico	98	<i>Cupriavidus gilardii</i> (EU024163)	91
0710BR-F2	1	Betaproteobacteria no cultivada (EF665821)	Bosque	99	<i>Cupriavidus gilardii</i> (EU024163)	90
0710BR-E12	1	Bacteria no cultivada (JN850384)	Biofilm en tubo de lava	91	<i>Cupriavidus gilardii</i> (EU024163)	90
0710BR-F6	1	Bacteria no cultivada (GQ860132)	Sedimentos de un río	87	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i> (AY879297)	84
0710BR-B4	1	Burkholderiales no cultivado (KJ191913)	Suelo bajo <i>Pinus massoniana</i>	95	<i>Zhizhongheella caldifontis</i> (KF771277)	92
0710BR-B2	1	<i>Polaromonas</i> sp. no cultivado (JF719330)	Sedimento glacial	98	<i>Polaromonas jejuensis</i> (EU030285)	99
0710BR-E9	1	<i>Methylibium</i> sp. (JQ977655)	Rizoplaneo	94	<i>Methylibium petroleiphilum</i> (CP000555)	94
0710BR-E1	1	Bacteria no cultivada (EF516619)	Suelo de pradera	96	<i>Cupriavidus gilardii</i> (EU024163)	89
Firmicutes						
0710BR-G8	1	<i>Bacillus cereus</i> (JX855262)	Mina de cobre	97	<i>Bacillus mycoides</i> (ACMU01000002)	97

0710BR-B10	1	<i>Pelosinus</i> sp. (GU255507)	Suelo de zona termal	97	<i>Pelosinus fermentans</i> (DQ145536)	97
0710BR-A10	1	Bacteria no identificada (AJ229233)	Suelo sin vegetación	96	<i>Dendrosporobacter quercicolus</i> (AJ010962)	92
0710BR-D9	1	Bacteria no cultivada (GU270806)	Suelo de turba	96	<i>Selenomonas laticifex</i> (AF373024)	87
0710BR-E4	1	<i>Bacillaceae</i> no cultivado (EF019629)	Rizofera de álamo	92	<i>Bacillus mycoides</i> (ACMU01000002)	92
0710BR-D1	1	Bacteria no cultivada (HE804591)	Lepidocrocita	93	<i>Dendrosporobacter quercicolus</i> (AJ010962)	92
0710BR-C8	1	<i>Paenibacillus ferrarius</i> (KF925453)	Suelo mineral de hierro	99	<i>Paenibacillus pocheonensis</i> (AB245386)	98
Actinobacteria						
0710BR-D11	2	Actinobacteria no cultivada (HG325737)	Depósito rojo en túnel de granito	98	<i>Solirubrobacter pauli</i> (AY039806)	88
0710BR-F1	1	Bacteria no cultivada (HM445493)	Biofilm en tubo de lava	91	<i>Pseudonocardia tetrahydrofuranoxydans</i> (AJ249200)	86
0710BR-B6	1	Bacteria no cultivada (HM445368)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	93
0710BR-C10	1	Bacteria no cultivada (HM445368)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	91
0710BR-B1	1	Bacteria no cultivada (HM445368)	Biofilm en tubo de lava	96	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	94
0710BR-C2	1	Bacteria no cultivada (KC331763)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Pseudonocardia bannensis</i> (FJ817375)	95
Chloroflexi						
0710BR-D12-2	2	Chloroflexi no cultivado (JX859933)	Permafrost	99	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> (CP000027)	84
0710BR-F7	1	Bacteria no cultivada (AM292613)	Suelo de mina de uranio	97	<i>Dehalogenimonas alkenigignens</i> (JQ994266)	84
0710BR-F3	1	Chloroflexales no cultivado (GU205309)	Sedimento de la Cueva Roraima Sur	89	<i>Ktedonobacter racemifer</i> (ADVG01000004)	86
0710BR-D8	1	Bacteria no cultivada (LN573888)	Residuos vegetales	88	<i>Thermogemmatispora onikobensis</i> (AB547912)	80
Deltaproteobacteria						
0710BR-H7	1	Bacteria no cultivada (JN615736)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Desulfacinum infernum</i> (L27426)	82
0710BR-B9	1	Bacteria no cultivada (AF523967)	Humedal boscoso	94	<i>Geothermobacter ehrlichii</i> (AY155599)	81
0710BR-A8	1	Bacteria no cultivada (JF265854)	Biofilm en tubo de lava	93	<i>Hippea maritima</i> (CP002606)	82
0710BR-D5	1	Bacteria no cultivada (JF266214)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Desulfosoma profundum</i> (HM056226)	83
0710BR-D4	1	Bacteria no cultivada (JF265854)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Hippea maritima</i> (CP002606)	83
Gammaproteobacteria						
0710BR-H8	1	<i>Nevskia ramosa</i> (AB518684)	No especificada	96	<i>Nevskia ramosa</i> (ATVI01000001)	95
Gemmatimonadetes						
0710BR-D12	1	Bacteria no cultivada (AF432621)	Suelo de rizosfera	99	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	90

Capítulo 4

Nitrospirae						
0710BR-A12	1	Bacteria no cultivada (HM545202)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Nitrospira moscoviensis</i> (X82558)	96
Planctomycetes						
0710BR-E11-2	1	Bacteria no cultivada (EF516834)	Suelo de pradera	99	Candidatus <i>Kuenenia stuttgartiensis</i> (CT573071)	81
Verrucomicrobia						
0710BR-F12	1	Verrucomicrobiae no cultivado (EU043541)	Dunas	98	<i>Terrimicrobium sacchariphilum</i> (GU129926)	89
Bacterias sin clasificar*						
0710BR-H4	1	<i>Gemmata</i> sp. no cultivado (JF833923)	Suelo de mina de potasio	87	-	-
0710BR-E6	1	Bacteria no cultivada (JQ380017)	Muestra de suelo	89	-	-
0710BR-C6	1	Bacteria no cultivada (FJ719035)	Sedimentos de acuífero	88	-	-
0710BR-H9	1	Bacteria no cultivada (JF266214)	Biofilm en tubo de lava	92	-	-
0710BR-A7	1	Bacteria no cultivada (DQ404819)	Sedimento contaminado	88	-	-

*No fue posible clasificar los OTUs con un porcentaje de similitud menor del 80% (EZtaxon), por lo que no se especifica la especie cultivada más cercana.

El análisis matemático de la distribución de las secuencias de los clones, mostró que las curvas de rarefacción obtenidas a nivel de especie (97% de similitud) y de género (95% de similitud) no llegaron a alcanzar la asíntota (Figura 4.5). La obtenida a nivel de género (80% de similitud) ya se encontraba alcanzando la fase estacionaria con el número de clones analizado.

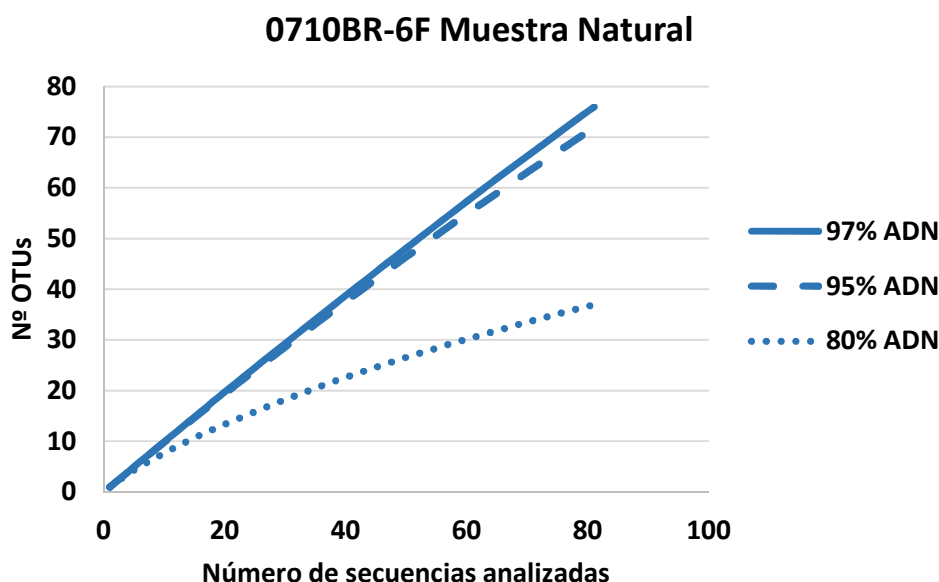


Figura 4.5 Curvas de rarefacción de la muestra natural 0710BR-6F. Se representa el número de secuencias analizadas frente al número de OTUs generados a tres niveles de similitud: especie (97%), género (95%) y filo (80%). Genoteca de ADN (—).

Estos resultados indicaron que la muestra de depósitos negros de la Mina das Aveleiras presentaba una amplia diversidad de comunidades bacterianas.

4.3.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las relaciones filogenéticas establecidas entre las cepas seleccionadas de los depósitos negros de la Mina das Aveleiras y las cepas de referencia de especies homólogas se estudiaron en base al análisis de la región ARNr 16S.

Se escogieron 5 clones cuyas cepas homólogas estaban relacionadas con la oxidación del manganeso, agrupadas en Acidobacteria y Alphaproteobacteria. Las secuencias seleccionadas fueron: 0710BR-E10, 0710BR-H12, 0710BR-B8, 0710BR-C5 y 0710BR-B12. Para el análisis, se denominaron según el código de la placa de secuenciación y el número de clon: 1768RAA000E10 (clon 77), 1768RAA000H12 (clon 96), 1768RAA000B8 (clon 58), 1768RAA000C5 (clon 35) y 1768RAA000B12 (clon 90), respectivamente.

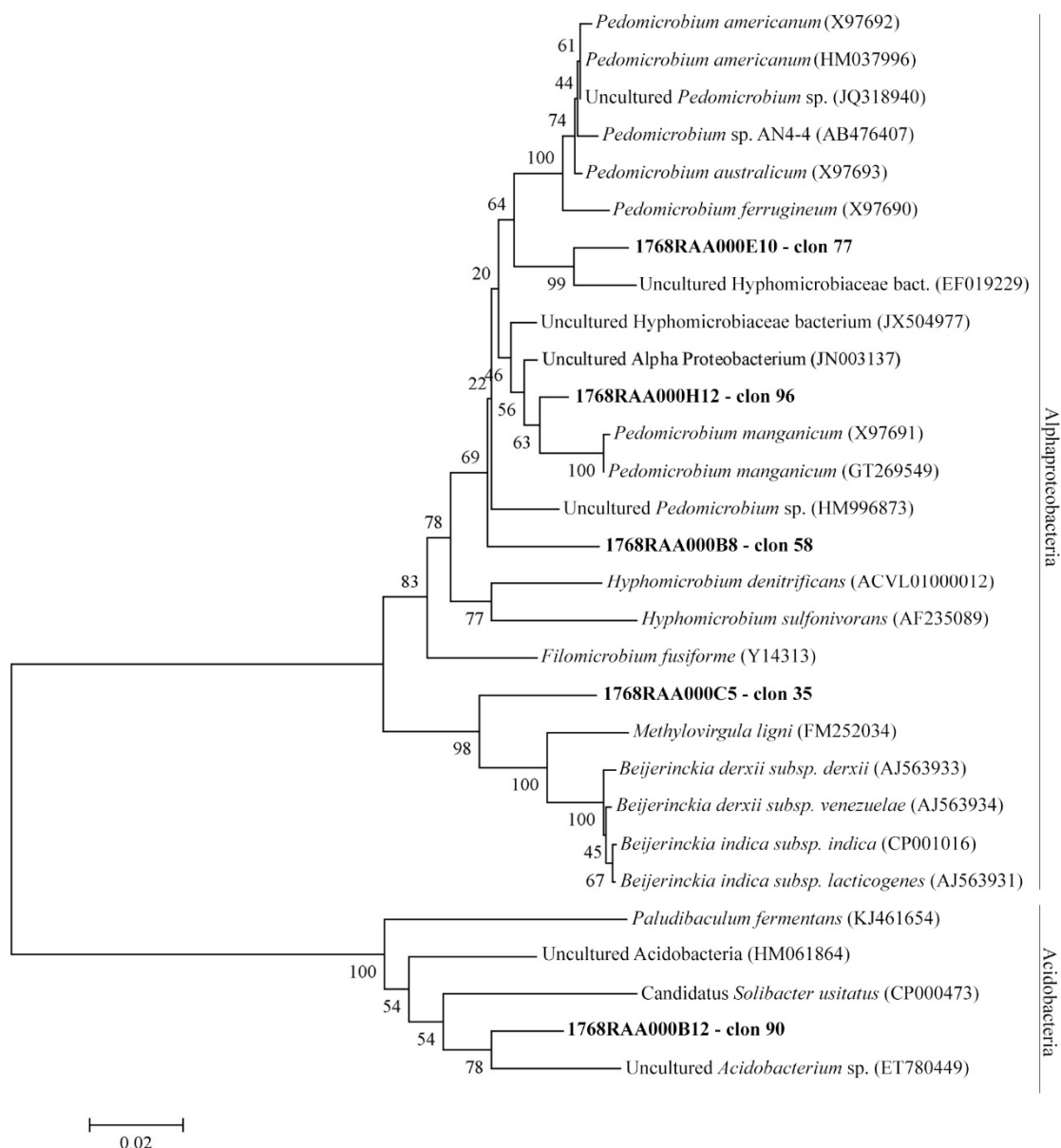


Figura 4.6 Árbol filogenético de especies asociadas a la oxidación de manganeso en las muestras de depósitos negros de la Mina das Aveleiras, Portugal. El árbol se obtuvo aplicando el método “Neighbour-joining”. Los valores “bootstrap” quedan expresados como porcentajes de 1000 réplicas. La barra representa 0.02 cambios de nucleótido por posición.

El árbol filogenético obtenido se muestra en la Figura 4.6. Los clones 77, 35 y 90 estuvieron apoyados por altos valores de “bootstrap” (78-99%) por lo que resultaron ser clados consistentes. El clon 77 formaría parte de la familia *Hyphomicrobiaceae*. El clon 35 estuvo integrado en otro clado distinto, pero también dentro de Alphaproteobacteria. Su alto valor de “bootstrap” indicó cercanía a la especie *Beijerinckia derxii* subsp. *derxii*. Por su parte, el clon 90 quedó bien integrado dentro del filo Acidobacteria, mostrando cercanía con una especie del filo Acidobacteria no cultivada y lejana a su vez de *Candidatus Solibacter usitatus*.

Los bajos porcentajes obtenidos para los clones 58 y 96 plantearon la existencia de nuevas especies, ya que la afiliación a bacterias ya descritas fue cuestionable.

4.3.3 CARACTERIZACIÓN MINERALÓGICA Y MORFOLÓGICA

Las observaciones mediante microscopio electrónico de barrido (FESEM) pusieron de manifiesto la presencia de microorganismos y agregados microbianos en las muestras de los depósitos negros (Figura 4.7).

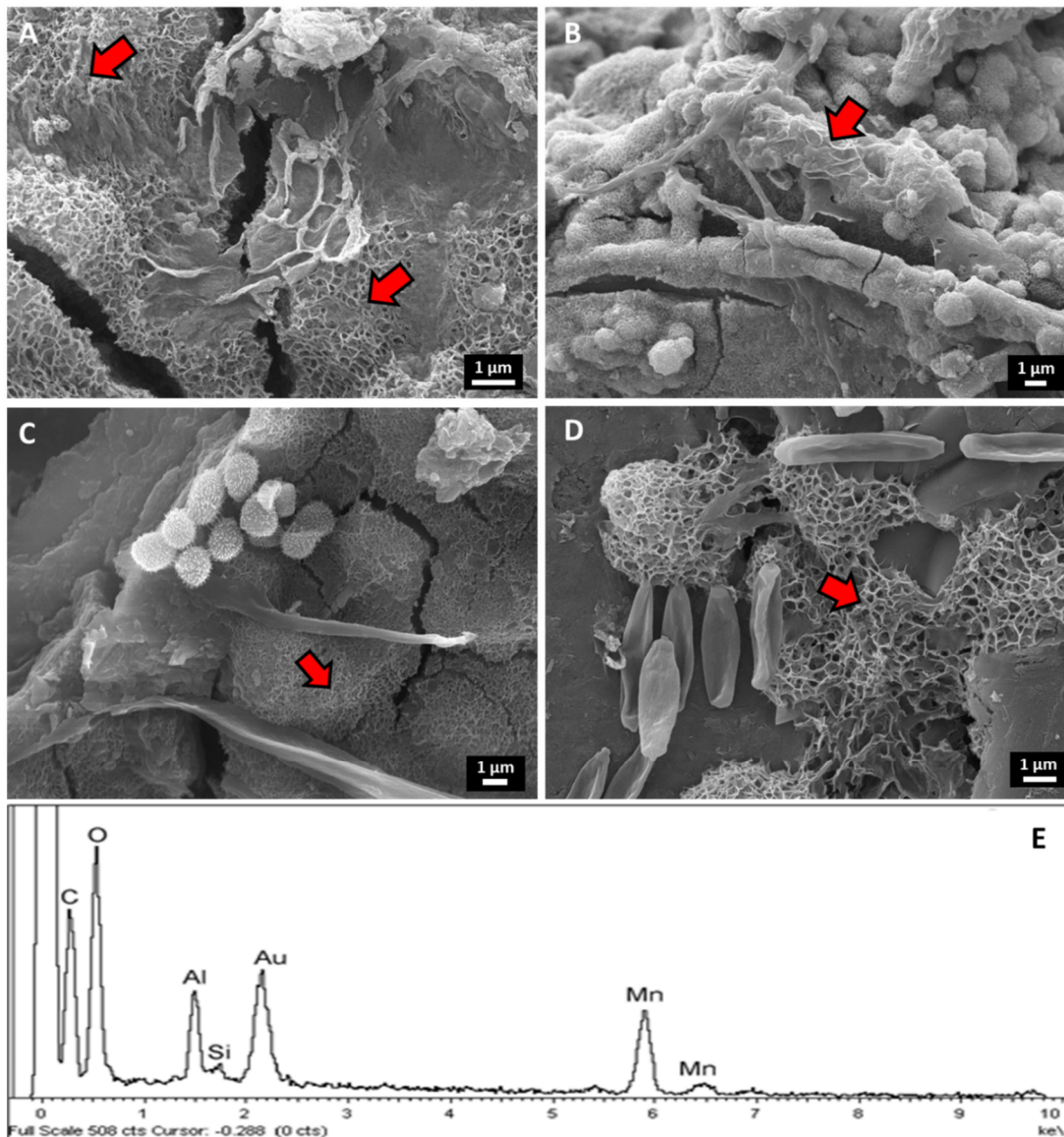


Figura 4.7 Imágenes FESEM y espectro EDS de la muestra 0710BR-6F de depósitos negros de la Mina das Aveliras. A. y B. Agregados porosos nodulares ricos en Mn y embebidos en EPS. C. Células cocoides con ornamentación equinulada sobre agregados ricos en Mn. D. Detalle de los agregados ricos en Mn, presentando la morfología típica de los óxidos de manganeso biogénicos, junto a células bacterianas bacilares. E. Espectro EDS mostrando las bandas características de óxidos de manganeso biogénicos. Las flechas rojas en las imágenes señalan los agregados reticulados de los óxidos de manganeso.

Fue notable la presencia de abundantes agregados porosos nodulares y reticulados formados por fibras ricas en Mn embebidas en EPS (Figura 4.7 A y B). Además, también se observaron células cocoides con ornamentación equinulada (Figura 4.7 C) y bacterias con forma bacilar (Figura 4.7 D).

Los análisis elementales mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) revelaron que los depósitos negros eran ricos en C y Mn. También se detectó la presencia de Al y Si (Figura 4.7 E).

4.4 DISCUSIÓN

Las afiliaciones filogenéticas de los clones secuenciados de las muestras de la Mina das Avelerias mostraron similitudes con bacterias procedentes de biofilms presentes en las paredes de diversos tubos de lava del archipiélago de Azores (Portugal) y de la pared de un cráter en roca basáltica, un tipo de roca volcánica que a su vez forma parte de la composición de la mayor parte de los tubos de lava (Hathaway y col., 2014a). La similitud con bacterias no cultivadas de tubos volcánicos también se comprobó en las muestras de depósitos negros de la mina de agua de Paranhos, excavada en roca granítica al igual que la Mina das Aveleiras, tanto en el Capítulo 3 de esta tesis como en los estudios llevados a cabo por Miller y col. (2012b).

Por su parte, Snider (2010) detectó entre los hábitats de los homólogos más cercanos de los clones de muestras del techo y suelo de dos tubos de lava, Roots Galore y Pahoehoe (Nuevo México), nódulos de ferromanganeso, biofilms oxidantes de hierro y biofilms de la mina Zloty Stok (República Checa), excavada en los Sudetes, unas montañas forestales y mineras compuestas por rocas volcánicas, gneis, esquistos y gran abundancia de granitos (Tomczyk-Żak y col., 2013). Snider (2010) también detectó bacterias de los géneros *Gemmatimonas*, *Nitrospira* e *Hyphomicrobium*, los cuales estuvieron asimismo representados en las muestras estudiadas de la Mina das Aveleiras. Además, las comunidades bacterianas de los tubos de lava de Azores y Hawái estudiados por Hathaway y col. (2014a) estuvieron afiliadas principalmente a Alphaproteobacteria, Acidobacteria y Actinobacteria, un esquema coincidente con el obtenido para las de los depósitos negros de la Mina das Aveleiras.

Estos datos sugieren que ambos ambientes subterráneos, tubos de lava y minas graníticas, compartirían algunas características relacionadas con la existencia de ciertas comunidades bacterianas comunes. Una posibilidad es que el origen volcánico de los tubos de lava y los túneles graníticos estuviera implicado en este hecho, aunque no hay evidencias al respecto.

Las procedencias de otras bacterias no cultivadas detectadas en los depósitos negros estudiados estuvieron relacionadas con distintos ambientes subterráneos, sedimentos, suelos y minerales, lo que se encuentra en consonancia con el entorno

que proporciona la Mina das Azeleiras, entre los que se pueden nombrar: depósitos de la pared de granito del túnel de Paranhos, suelo de una mina de potasio, mina de cobre, sedimento contaminado con arsénico, suelo de una mina de uranio, biofilms de una mina de arsénico y oro, sedimentos de un acuífero y suelo de una zona termal.

Entre dichas fuentes de aislamiento también son comunes aquellas relacionadas con manganeso y hierro, como la lepidocrocita (un tipo de mineral de hidróxido de hierro con impurezas de manganeso) en suelo húmedo, biofilms con depósitos de manganeso de los que procede la alfa-proteobacteria *Pedomicrobium manganicum* (Sly y col., 1988) y un suelo con minerales de hierro del que se aisló *Paenibacillus ferrarius* (Cao y col., 2015), perteneciente al filo Firmicutes. Ambos elementos químicos aparecen asociados con frecuencia en los depósitos de ferromanganeso presentes en esta clase de ambientes similares a la Mina das Azeleiras.

Dentro de Alphaproteobacteria, se detectaron otras especies como *Pedomicrobium manganicum*, *Pedomicrobium australicum* e *Hyphomicrobium sulfonivorans*, bacterias filamentosas ubicuas en ambientes ricos en manganeso, debido a que son capaces de oxidar dicho elemento e inducir su precipitación, formando depósitos negros de óxidos de manganeso (Manolache y Onac, 2000). De hecho, *P. manganicum*, *P. australicum* e *Hyphomicrobium* sp. también formaron parte de las genotecas de los depósitos negros del túnel de Paranhos, poniendo de manifiesto que representan parte importante de la comunidad bacteriana de estos ambientes con abundancia de manganeso. Los depósitos presentes en las paredes de ambas minas recalcan la teoría de que dichas bacterias se encontrarían implicadas en la formación de los precipitados negros.

La especie representativa del filo Alphaproteobacteria fue *Methylocapsa aurea* (7,4%), una bacteria metanotrofa facultativa, lo que implica que puede emplear el gas metano como fuente de carbono y energía, siendo abundante en suelos ácidos y turberas (Dunfield y col., 2010). En estos ambientes se suele producir una cantidad considerable de metano, de manera que una parte del mismo es consumido por las bacterias metanotrofas, por lo que desempeñan un importante papel en la reducción de los niveles de metano atmosféricos. Dunfield y col. (2007) especularon con la teoría de que dicha estrategia metabólica microbiana convertiría a los microorganismos metanotrofos en agentes activos interesantes desde el punto de vista de las técnicas biotecnológicas de biorremediación para la lucha contra el efecto invernadero causante del calentamiento global. Desde este punto de vista y debido a que las secuencias relacionadas con el género *Methylocapsa* fueron abundantes en la genoteca de la muestra de depósitos negros (7,4% del total), la Mina das Azeleiras podría ser un lugar interesante para la búsqueda y aislamiento de estos microorganismos.

El filo Acidobacteria también estuvo presente en gran porcentaje, aunque la mayoría de las especies bacterianas mostraron similitudes menores del 90%, lo que imposibilita cualquier adscripción.

El filo Firmicutes se encontró igualmente en un porcentaje considerable (9%). Algunos de sus géneros más representativos fueron *Bacillus* y *Paenibacillus*, los cuales se aislan frecuentemente de ambientes hipogeos, como cuevas o catacumbas (De Leo y col., 2012). Otra especie destacable perteneciente a este filo fue *Pelosinus fermentans*, que posee la habilidad de reducir metales (Brown y col., 2012).

El filo Actinobacteria alcanzó también una abundancia moderada en los depósitos negros de la Mina das Aveleiras, abarcando casi un 10% de las secuencias totales, donde se detectó un clon relacionado con el género *Pseudonocardia* (2,5%) y otros más que, por su baja similitud con especies cultivables, impiden su adscripción. El género *Pseudonocardia* aparece frecuentemente en suelos (Sahin y col., 2014) y en ambientes subterráneos, tanto en cuevas como en catacumbas (Barton y col., 2007; De Leo y col., 2012). Por ejemplo, se detectaron también especies de *Pseudonocardia* en los depósitos de moonmilk del túnel de Paranhos estudiados en esta tesis, además de en las colonizaciones blancas de tres cuevas españolas: Altamira (Cuezva y col., 2009; Portillo y col., 2009), Ardales y Santimamiñe (Stomeo y col., 2008). Concretamente en las cuevas de Ardales y Santimamiñe, la colonización y crecimiento de *Pseudonocardia* sp. se vio favorecido por la presencia de minerales de la arcilla (Stomeo y col., 2008). La detección de Al y Si mediante el análisis EDS (Figura 4.7 E) apuntaron a la existencia de minerales de la arcilla en las muestras de los depósitos negros de la Mina das Aveleiras, sugiriendo este hecho que su presencia pudo beneficiar el desarrollo de *Pseudonocardia* sp.

Los filos Chloroflexi y Verrucomicrobia también son frecuentes en cuevas (Lee y col., 2012), aunque en el caso de la Mina das Aveleiras únicamente representaron el 6% y el 1%, respectivamente, del total de las bacterias adscritas a estos filos.

En el filo Nitrospirae, se detectó una secuencia cercana a la bacteria quimiolitotrofa obligada *Nitrospira moscoviensis* (Ehrich y col., 1995). Al igual que en las muestras de depósitos negros del túnel de Paranhos estudiadas en esta tesis, su presencia podría sugerir la ocurrencia de procesos de biomineralización en esta mina.

Los análisis de las relaciones filogenéticas entre las cepas presumiblemente implicadas en la oxidación del manganeso en la Mina das Aveleiras y las cepas de referencia de especies homólogas (Figura 4.6), constataron que las bacterias seleccionadas se agrupaban en los filos Acidobacteria y Alphaproteobacteria.

El clon 77 podría estar implicado en la oxidación del manganeso, al igual que sus homólogos cercanos de la familia *Hyphomicrobiaceae*. Además, todo apunta a la coexistencia en el mismo ambiente de bacterias oxidantes y reductoras de Mn, al

poseer el clon 35 cercanía con la especie *Beijerinckia derxii* subsp. *derxii*, poseedora de la enzima Mn-SOD, superóxido dismutasa que contiene manganeso (Moore y col., 1984).

Por otra parte, mediante FESEM-EDS se constató la presencia de manganeso en las muestras estudiadas. Los agregados reticulados poseían la morfología típica de los óxidos de manganeso biogénicos (Figura 4.7), descrita con anterioridad por Friedrich y col. (2011) y Miller y col. (2012a).

La detección de una composición enriquecida en C y Mn de las muestras mediante análisis elementales por EDS (Figura 4.7 E), evidenciaron una relación entre los microorganismos y la formación de estos depósitos secundarios ricos en Mn. No hay que olvidar además el hecho de que los depósitos se encontraban embebidos en EPS y junto a diferentes tipos de microorganismos.

En base a todos los motivos expuestos, los depósitos negros de la Mina das Aveliras podrían estar compuestos principalmente por óxidos de manganeso biogénicos, originados mediante procesos microbianos (Spilde y col., 2005). La presencia de bacterias identificadas en este trabajo capaces de habitar en ambientes inhóspitos y con la capacidad de oxidar el Mn, junto con los EPS asociados a los depósitos negros, apoyan la idea de que existe un proceso biogénico que da lugar a los depósitos ricos en Mn.

CAPÍTULO 5

TUBOS DE LAVA DE LA PALMA Y GRAN CANARIA (ISLAS CANARIAS, ESPAÑA)

5.1 LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS TUBOS DE LAVA CANARIOS

5.1.1 CUEVA DEL LLANO DE LOS CAÑOS

La Cueva del Llano de los Caños se sitúa en el término municipal de Mazo, isla de La Palma, próxima a los vecindarios de La Sabina y Tirimaga (Figura 5.1 A). Su única entrada se abre en un llano al pie de la montaña de La Horqueta, sobre la ladera de orientación este que se conoce como Los Caños. Es una cavidad conocida desde hace años tanto por los espeleólogos de la isla (Dumpiérrez y col., 1997) como por los lugareños, poseyendo incluso restos arqueológicos correspondientes a los habitantes prehispánicos de La Palma (benahoaritas).

En 1995, la Delegación de La Palma del Grupo de Espeleología de Canarias (G.E.C.) Benisahare (colectivo renombrado desde 2003 como “G.E. Tebexcorade - La Palma”) llevó a cabo una topografía de la cueva, estimando un desarrollo de 360 m distribuidos en un ramal principal y algunas pequeñas ramificaciones laterales. Desde ese momento, la cavidad pasó a formar parte de la lista de cuevas ya catalogadas en la isla, con el código LP/MZ-04, y quedó al margen de las exploraciones punteras, que se fueron centrando en otras zonas de La Palma a medida que se constituía su Catálogo de Cavidades (Fernández Lorenzo, 2000; 2007).

Durante el verano de 2007, dicho grupo de exploradores advirtieron la presencia de un paso estrecho soplador (con unos 5 cm de altura) en el extremo superior de la cavidad, con una corriente de aire fortísima que generaba un sonido silbante en las estalactitas. La localización de este paso diminuto llevó a emprender una desobstrucción que acabó facilitando el acceso a una zona desconocida. Así, la Cueva de los Caños pasó de los 360 m ya conocidos a poseer más de 1000 m, convirtiéndose en la cuarta cueva de mayor desarrollo de La Palma (Fernández y col., 2015). El nuevo tramo de cueva descubierto tras el paso estrecho se desveló como un tubo volcánico de dimensiones sorprendentes, tanto en altura y anchura, como en desarrollo, con unos 835 m de longitud. El hallazgo comprendió nudos laberínticos, galerías de grandes dimensiones, zonas con raíces, formaciones lávicas y espeleotemas extraordinariamente bien conservados. Fue de tal magnitud que los exploradores decidieron bautizarlo como “Galerías de Los Zapadores” (Figura 5.2 B y C), en honor al duro trabajo de desobstrucción realizado que permitió descubrirlo (Fernández y col., 2015).

El tubo de lava, aun estando bien conservado, mostraba zonas derrumbadas de aspecto muy inestable. Su poca profundidad, unos 4 m con respecto a la superficie, era la responsable de que en sus galerías de grandes dimensiones fueran frecuentes este tipo de colapsos. También se observaron numerosas raíces a causa de la cercanía de la superficie.

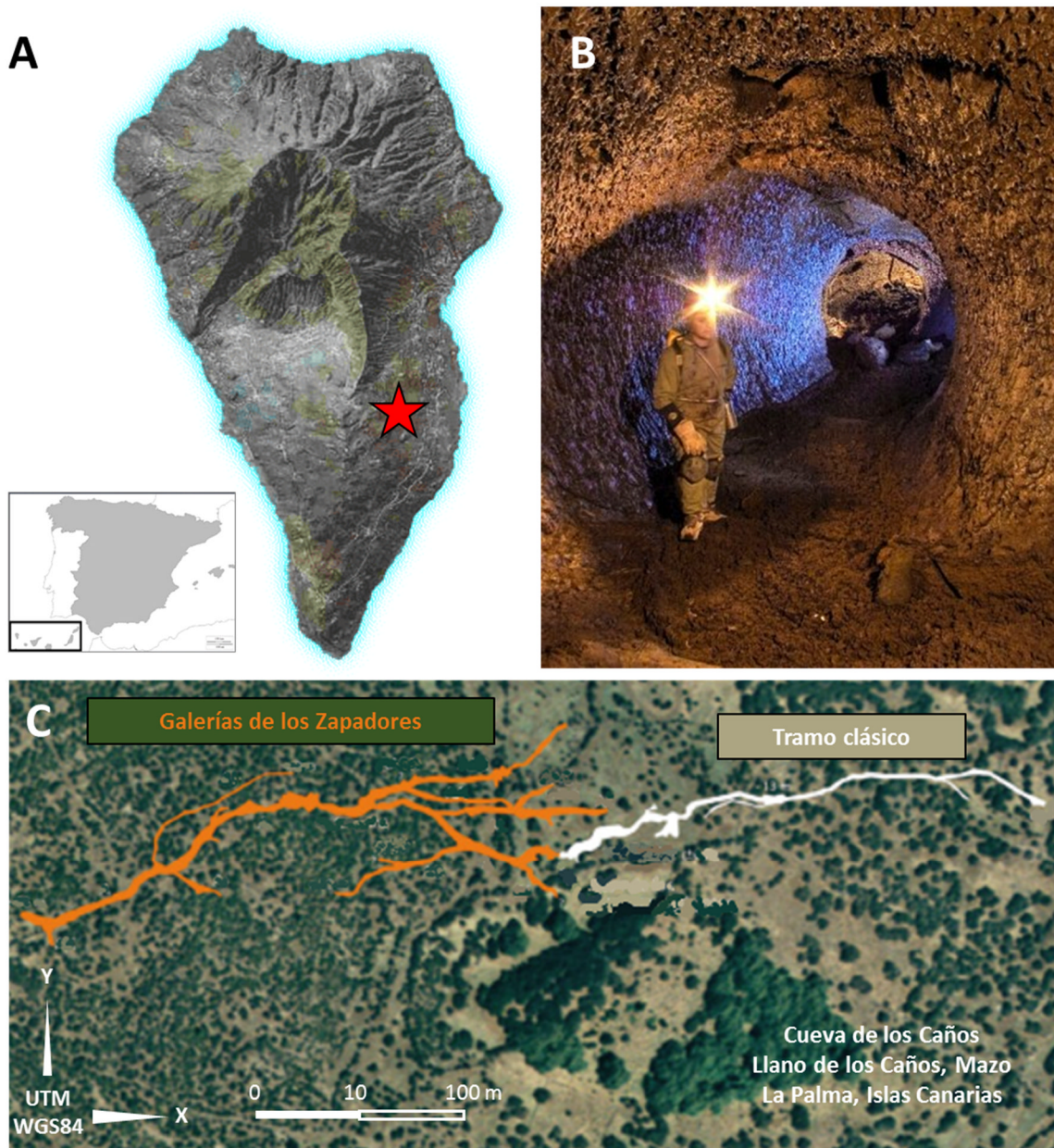


Figura 5.1 A. Localización de la Cueva del Llano de los Caños en La Palma, indicada con una estrella roja. B. Sección circular del tubo de lava principal de las Galerías de los Zapadores de la Cueva del Llano de los Caños. C. Topografía de la Cueva del Llano de Los Caños, indicando en color blanco el tramo que se conocía antes del descubrimiento de las Galerías de los Zapadores, en color naranja. Fuente: modificado de Fernández y col. (2015).

La progresión por las ramificaciones a lo largo de la Cueva del Llano de los Caños es arriesgada, puesto que en algunos casos los derrumbes de grandes bloques provenientes del techo originan pequeños pozos por los que hay que descender para su exploración, con el consiguiente riesgo de atrapamiento, motivo por el cual aún permanecen parcialmente sin topografiar.

La ramificación derecha del tubo principal conduce al llamado “Nudo central” de la cueva, una sala de dimensiones relativamente amplias desde donde el tubo continúa tanto en sentido ascendente como descendente. Presenta a su vez pequeños

tubos laterales, desarrollados en torno a grandes columnas, en un magnífico estado de conservación general y con formas primarias bien representadas, como marcas de flujo lávico laminar, estalactitas de lava, etc. En la parte media de este nudo, se puede apreciar un colapso del techo considerable, con derrumbamiento de grandes bloques.

Desde este punto, el tubo principal sigue ascendiendo y suaviza su pendiente, hasta llegar a la “Sala terminal”, donde el avance se detiene por un sifón de lava, tras el cual se supone que continúa la cavidad, aunque hasta ahora no se ha localizado una conexión desde el interior ni tampoco desde el exterior que permita su exploración (Naranjo y col., 2014).

Un dato importante es que la superficie quedó despejada de vegetación arbustiva tras un incendio en el verano de 2012, por lo que la zona se encuentra actualmente en proceso de recuperación.

La Cueva de los Caños es rica en fauna troglobia (García y González, 1998) y también tiene gran valor científico por la presencia de minerales secundarios, como depósitos negros orgánicos y mucolitos, que pueden estar asociados a microorganismos.

5.1.2 MINA DE LOS CERNÍCALOS

La Mina de los Cernícalos está situada en el municipio de Telde, en el este de la isla de Gran Canaria (Figura 5.2 A), sobre terreno volcánico de creación relativamente reciente, correspondiente al tercer ciclo volcánico de la isla y a erupciones cuaternarias. Este municipio se encuentra a sólo 9,5 Km de la capital grancanaria, enclavado en una gran campiña, denominada “La Vega Mayor” por su fertilidad y extensión. En los alrededores se encuentran numerosos vestigios arqueológicos y cuevas, debido a que esta zona fue, en época prehistórica, uno de los dos reinos en los que se dividía la isla de Gran Canaria.

Concretamente, la mina se localiza a unos 550 m de altitud en el Barranco de los Cernícalos, el cual atesora en sus 12 km de longitud un alto valor ecológico y paisajístico, con elevada biodiversidad y presencia de especies vegetales endémicas, al disponer de un caudal permanente de agua. Estas características incitaron a su inclusión en la Reserva Especial de Los Marteles, que forma parte de la Red Canaria de Espacios Naturales, y en el Paisaje Protegido de Lomo Magullo (Santana Ramírez y Suárez Alejandro, 2008).

Aunque en Telde se conocen las obras de captación de aguas subterráneas mediante minas de agua desde el siglo XVI, estas comenzaron a proliferar principalmente a finales del siglo XVIII y principios del XIX, debido a la creciente especialización agraria que hizo aumentar la demanda hídrica, potenciada por la producción de azúcar, tabaco, plátanos, tomates, cereales, patatas, etc. Los túneles

excavados desembocaban en el acuífero saturado de las capas aluviales de los barrancos, para extraer agua por medio de la gravedad en cantidades suficientes para el riego (Santana Ramírez y Suárez Alejandro, 2008).

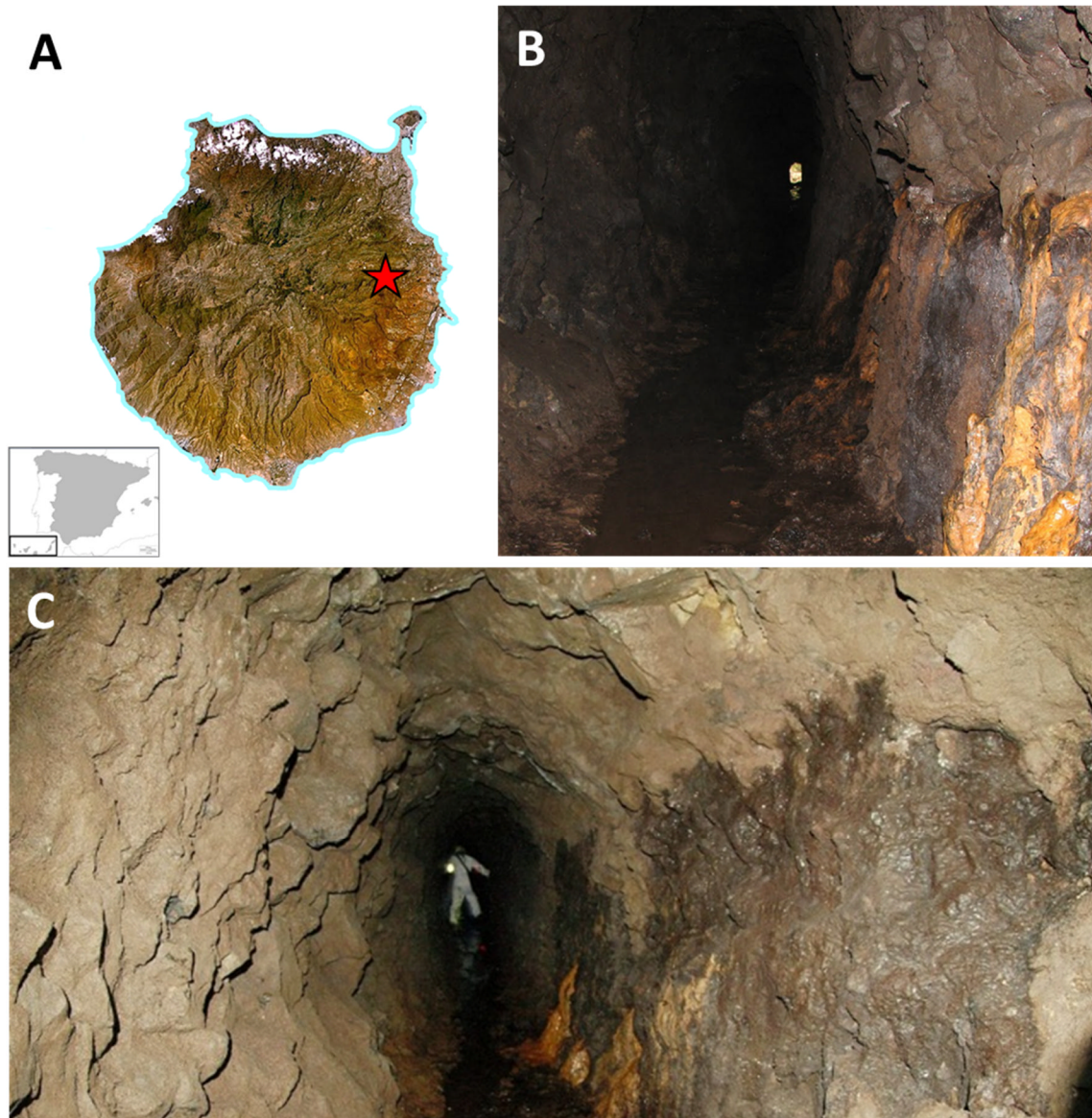


Figura 5.2 A. Localización de la Mina de los Cernícalos en Gran Canaria, indicada con una estrella roja. B. Vista desde el interior de la Mina de los Cernícalos, en la que se observa la limitada anchura de la galería. El punto de luz corresponde al orificio de entrada. C. Sección circular estrecha del tubo de lava de la Mina de los Cernícalos.

La Mina de los Cernícalos es realmente un tubo de lava, empleado antiguamente para el aprovechamiento de las aguas corrientes y manantes que nacen en el costado y lecho del barranco en el que se encuentra, lo que le otorga unas características algo diferentes a las de otras minas de la región. Muchas solían ser zanjas recubiertas de obra de fábrica, presentando labores de consolidación, como entibaciones con muros de piedra y techamientos en dintel con lajas, formando túneles que seccionaban los cauces (Santana Ramírez y Suárez Alejandro, 2008). Sin

embargo, la estructura y la solidez geológica del tubo de lava de la Mina de los Cernícalos fueron probablemente responsables de que no se necesitara ninguna clase de intervención en la galería.

Esta mina posee un desarrollo pequeño, de apenas 100 m de longitud y 1 m de ancho (Figura 5.2 B y C), con un flujo de agua moderado que discurre por el suelo de la cavidad, ya que tampoco se construyeron acequias para su canalización. Se desconoce la historia y el propósito exacto de esta cavidad, debido a que existe muy poca información documentada sobre la misma. De hecho, a pesar de tener asignado el código GC/TD-03, aún no se encuentra incluida oficialmente en el Catálogo de Cavidades de Gran Canaria (Fernández Lorenzo y Naranjo Morales, 2011).

Este tubo de lava está compuesto por lavas basaníticas y basáltico olivínico-piroxénicas, provenientes del ciclo Roque Nublo, el segundo episodio volcánico sucedido en la formación de la isla (García Cacho y col., 1987), con depósitos dispersos de goethita y limonita.

En cuanto a la fauna del interior de la mina, existe presencia de *Pseudoniphargus* sp., crustáceo que habita en cuevas acuáticas.

También se observan algunos espeleotemas a lo largo de la galería, como depósitos negros de ferromanganeso recubriendo las paredes.

5.2 LOCALIZACIÓN Y RECOGIDA DE MUESTRAS

Para realizar el estudio de los espeleotemas de la Cueva del Llano de los Caños y de la Mina de los Cernícalos se llevaron a cabo campañas de muestreo en septiembre de 2012 y marzo de 2015, con el fin de caracterizar su morfología, identificar los microorganismos presentes y extraer información sobre las interacciones microbio-mineral.

Por una parte, en diferentes puntos de la pared del tubo volcánico de la Cueva del Llano de los Caños, se observaron depósitos orgánicos de color negro y consistencia pastosa (Figura 5.3 A), por lo que se tomaron muestras de los mismos, asignándoles la denominación de MZ04-1 (Figura 5.3 B). En este tubo de lava también se muestrearon mucolitos de aspecto gelatinoso en el tramo de las Galerías de los Zapadores, tanto en las paredes del tubo de lava como en el techo. Los mucolitos situados cerca del techo se denominaron MZ04-4 (Figura 5.3 C) y los hallados en las paredes MZ04-5 (Figura 5.3 D).

Estos muestreos llevados a cabo en la Isla de la Palma fueron realizados por la Dra. Valme Jurado y la Dra. Ana Miller, en colaboración con Octavio Fernández Lorenzo, espeleólogo del G.E. Tebexcorade - La Palma.

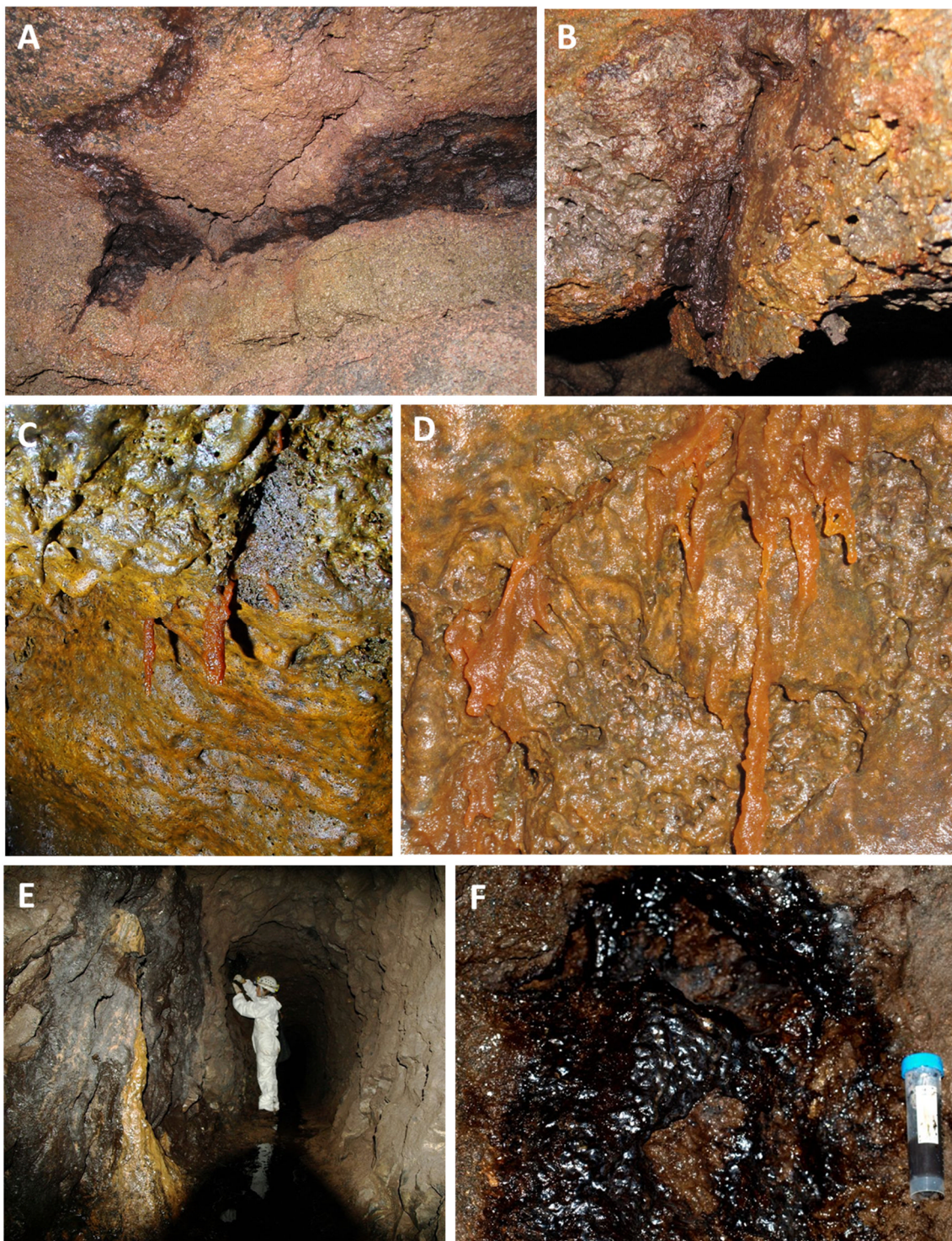


Figura 5.3 A. Depósitos orgánicos negros recubriendo la pared de la Cueva del Llano de los Caños (La Palma), especialmente las zonas con grietas. B. Detalle de la muestra MZ04-1, de consistencia pastosa. C. MZ04-4: Mucolitos presentes en el techo de las Galerías de los Zapadores de la Cueva del Llano de los Caños (La Palma). D. MZ04-5: Mucolitos hallados en la pared de las mismas galerías (La Palma). E. Muestreo de depósitos negros presentes sobre la pared de la Mina de los Cernícalos (Gran Canaria). F. Detalle de la muestra de depósitos negros de ferromanganeso de la Mina de los Cernícalos (Gran Canaria), denominada MNGC-1.

En lo que respecta a la Mina de los Cernícalos de la isla de Gran Canaria, se tomaron muestras de depósitos negros de ferromanganeso desarrollados sobre la

pared de la cavidad (Figura 5.3 E), denominadas MNGC-1 (Figura 5.3 F). Este muestreo fue realizado por la Dra. Valme Jurado en colaboración con Manuel Naranjo, de la Sociedad Entomológica Canaria Melansis.

Todas las muestras recogidas en los tubos de lava de las Islas Canarias se analizaron mediante técnicas moleculares, con la construcción de genotecas, y también mediante técnicas microscópicas. Además, se inocularon en medios de cultivo tanto sólidos como líquidos, con objeto de aislar bacterias. El estudio se complementó con un análisis comparativo de los depósitos de minerales secundarios mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE).

Por otra parte, en la muestra de depósitos negros MNGC-1 también se llevó a cabo el estudio del gen *mofA*.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 MUESTRA DE DEPÓSITOS ORGÁNICOS NEGROS MZ04-1 (LA PALMA)

➤ Bacterias cultivadas

Esta muestra presentó poco crecimiento en los medios de cultivo en placa, pudiéndose aislar únicamente 10 cepas bacterianas, agrupadas en 8 especies diferentes. La Tabla 5.1 recoge las identificaciones de los aislamientos, mostrándose las especies filogenéticamente más próximas disponibles en la base de datos Ez-Taxon.

Las afiliaciones filogenéticas de las cepas bacterianas aisladas de la muestra MZ04-1 se distribuyeron en los filos Firmicutes, Actinobacteria y la clase Gammaproteobacteria. El 90% de las bacterias aisladas correspondieron a Firmicutes y a Actinobacteria. Firmicutes fue el filo más abundante, mientras que la clase Gammaproteobacteria únicamente contuvo una cepa.

Los géneros más representados fueron *Streptomyces*, perteneciente al filo Actinobacteria, y *Bacillus*, perteneciente al filo Firmicutes, abarcando el 60% del total de secuencias obtenidas. Además, se aisló una única especie de los géneros *Brevibacterium*, *Brevibacillus*, *Nocardia* y *Pseudomonas*.

Respecto a su procedencia, el 50% de las cepas bacterianas más cercanas taxonómicamente a las aisladas de los depósitos orgánicos negros de la cueva del Llano de los Caños procedían de suelos. Un 30% englobó a *Streptomyces* con procedencias no especificada. Por otra parte, la especie *Nocardia anemiae* fue aislada de un paciente inmunodeprimido y *Pseudomonas indica* de un yacimiento de petróleo (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas aisladas de la muestra MZ04-1.

Cepa	Nº de aislados	Identificación molecular Ez Taxon (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)
Firmicutes				
MZ041-12-ROUF2	2*	<i>Bacillus pocheonensis</i> Gsoil 420 (AB245377)	Suelo de un campo de ginseng	98
MZ041-12-ROUF1	1	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> DSM 8801 (AM747813)	Suelo	100
MZ041-15-LX2	1	<i>Brevibacillus choshinensis</i> DSM 8552 (AB112713)	Suelo	92
MZ041-15-LX1	1	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 (AB363738)	Suelo árido cálido	95
Actinobacteria				
MZ041-12-ROUF4	1	<i>Streptomyces cirratus</i> NRRL B-3250 (AY999794)	No especificada	95
MZ041-15-LX5	1	<i>Streptomyces cirratus</i> NRRL B-3250 (AY999794)	No especificada	96
MZ041-15-M7-2	1	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178 (AB184737)	No especificada	98
MZ041-12-ROUF5	1	<i>Nocardia anaemiae</i> IFM 0323 (AB162801)	Paciente inmunodeprimido	98
Gammaproteobacteria				
MZ041-15-LX4	1	<i>Pseudomonas indica</i> IMT37 (AF302795)	Yacimiento de petróleo	97

* Aislamientos que comparten una similitud $\geq 99\%$.

➤ Cultivos de enriquecimiento

Los cultivos de enriquecimiento de la muestra de depósitos orgánicos negros con consistencia pastosa MZ04-1 mostraron crecimiento visible tras un periodo de incubación de diez días. El desarrollo bacteriano en el medio Rouf modificado no estuvo asociado con precipitados negros, sino que presentaron un color marrón claro permanente (Figura 5.4).



Figura 5.4 Matraz con la muestra de depósitos negros orgánicos MZ04-1 sembrada en medio de cultivo Rouf modificado, mostrando crecimiento y precipitados marrones.

Del cultivo de enriquecimiento en medio Rouf modificado de la muestra MZ04-1 se construyó además una genoteca de ADN, con el fin de detectar los microorganismos totales presentes en el mismo, en base a los resultados obtenidos en el análisis mediante DGGE descrito en el apartado 5.3.4. La genoteca de ADN fue elaborada con un total de 46 secuencias libres de quimeras.

La distribución de los diferentes filos en la muestra se presenta en la Figura 5.5. El filo Firmicutes fue el más abundante, abarcando el 70% del total de secuencias obtenidas.

El segundo filo más representado correspondió a Proteobacteria, el cual comprendió más de un cuarto del total de secuencias (26%), distribuido en las clases Alphaproteobacteria (17%), Gammaproteobacteria (7%) y Deltaproteobacteria (2%).

También se identificaron dos filos más con bajos porcentajes, concretamente Acidobacteria y Bacteroidetes, representados con un 2% cada uno.

Las identificaciones de las 46 secuencias obtenidas aparecen en la Tabla 5.2, quedando distribuidas en 27 OTUs.

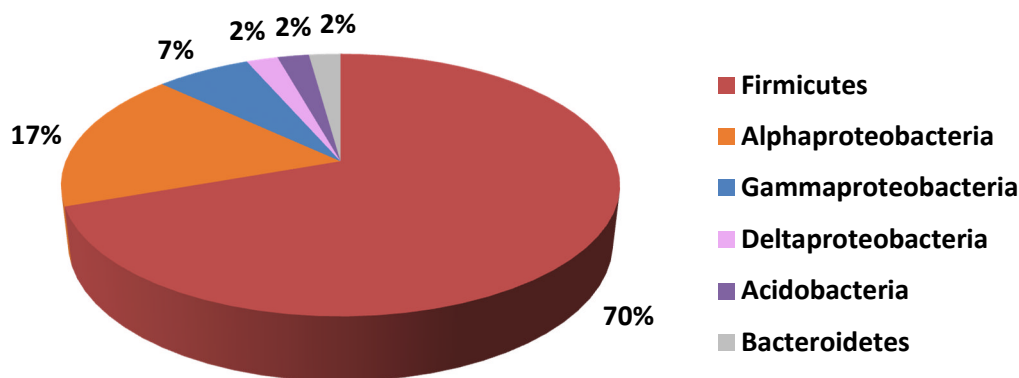


Figura 5.5 Distribución de las secuencias de la genoteca de ADN correspondiente al cultivo de enriquecimiento en medio Rouf modificado de los depósitos orgánicos negros MZ04-1 de la Cueva del Llano de los Caños.

La mayoría de los clones bacterianos analizados se incluyeron en el género *Paenibacillus* (39%) y la especie *Bacillus simplex* (31%), ambos pertenecientes al filo Firmicutes.

En lo que respecta al filo Proteobacteria, la clase Alphaproteobacteria estuvo representada por las especies *Reyranella graminifolia* y *Phreatobacter oligotrophus* y dos secuencias: una de ellas posiblemente afiliada al género *Hyphomicrobium* y otra a *Pedomicrobium*. Gammaproteobacteria contó con la especie *Lysobacter koreensis* como única integrante, abarcando todas las secuencias de esta clase.

Los filos minoritarios de Acidobacteria y Bacteroidetes y la clase Deltaproteobacteria estuvieron representados por secuencias con un bajo porcentaje de similitud y afiliación incierta.

Las secuencias obtenidas de la muestra del cultivo de enriquecimiento y sus identificaciones se analizaron según su procedencia, atendiendo a los datos del NCBI (Tabla 5.2). La mayoría correspondió a bacterias procedentes de suelos (24% del total) y entornos húmedos (39,1%), como sedimentos marinos, sedimentos de un lago y el agua de un humedal. Además, un 19,6% de los clones secuenciados mostraron similitudes con bacterias no cultivadas procedentes de depósitos orgánicos y biofilms en tubos de lava, estalactitas y otras cavidades subterráneas como tumbas etruscas, minas y el Monumento Nacional Cuevas de Oregón (EE.UU.). El porcentaje restante englobó a las fuentes de aislamiento menos frecuentes de la Tabla 5.2.

Tabla 5.2 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias totales obtenidas del cultivo de enriquecimiento en medio Rouf modificado de la muestra MZ04-1 (46 secuencias, 27 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Firmicutes						
MZ1CEB3	13	<i>Bacillus simplex</i> (KF424727)	Sedimentos marinos	99	<i>Bacillus simplex</i> (AB363738)	100
MZ1CEB1	3	<i>Paenibacillus mendelii</i> (NR_041929)	Semilla de guisante	99	<i>Paenibacillus mendelii</i> (AF537343)	100
MZ1CEH6	2	<i>Paenibacillus terrigena</i> (KM036082)	Ladrillo de un edificio	99	<i>Paenibacillus terrigena</i> (AB248087)	99
MZ1CEE4	2	<i>Paenibacillus rigui</i> (NR_116517)	Agua de un humedal	99	<i>Paenibacillus vulneris</i> (HE649498)	97
MZ1CEE5	1	<i>Paenibacillus terrigena</i> (NR_041398)	Suelo	99	<i>Paenibacillus terrigena</i> (AB248087)	93
MZ1CED6	1	<i>Paenibacillus terrigena</i> (NR_041398)	Suelo	99	<i>Paenibacillus terrigena</i> (AB248087)	98
MZ1CEF6	1	<i>Paenibacillus terrigena</i> (NR_041398)	Suelo	90	<i>Paenibacillus terrigena</i> (AB248087)	94
MZ1CEF2	1	<i>Paenibacillus terrigena</i> (NR_041398)	Suelo	99	<i>Paenibacillus terrigena</i> (AB248087)	99
MZ1CEG5	1	<i>Paenibacillus terrigena</i> (NR_041398)	Suelo	99	<i>Paenibacillus terrigena</i> (AB248087)	91
MZ1CEB6	1	<i>Paenibacillus terrigena</i> (NR_041398)	Suelo	99	<i>Paenibacillus terrigena</i> (AB248087)	91
MZ1CEA3	1	<i>Paenibacillus terrigena</i> (NR_041398)	Suelo	99	<i>Paenibacillus terrigena</i> (AB248087)	100
MZ1CEA2	1	<i>Paenibacillus terrigena</i> (NR_041398)	Suelo	99	<i>Paenibacillus terrigena</i> (AB248087)	100
MZ1CEC5	1	<i>Paenibacillaceae</i> no cultivado (JX505002)	Suelo	99	<i>Paenibacillus terrigena</i> (AB248087)	96
MZ1CEE6	1	<i>Paenibacillus</i> sp. (KJ914577)	Té rojo	98	<i>Paenibacillus vulneris</i> (HE649498)	98
MZ1CEH4	1	<i>Paenibacillus</i> sp. (AM162313)	Varios hábitats	99	<i>Paenibacillus terrigena</i> (AB248087)	98
MZ1CEH2	1	<i>Bacillus simplex</i> (HF584836)	Sedimentos marinos	93	<i>Bacillus simplex</i> (AB363738)	96
Alphaproteobacteria						
MZ1CEG6	2	Bacteria no cultivada (JN616168)	Depósito orgánico de pared de un tubo de lava	99	<i>Hyphomicrobium nitrativorans</i> (CP006912)	91
MZ1CEH5	2	Alphaproteobacteria no cultivada (FJ711211)	Estalactita	99	<i>Reyranella graminifolii</i> (AB839882)	98
MZ1CED3	1	<i>Rhizobiales</i> no cultivado (JQ796723)	Suelo de un bosque	99	<i>Phreatobacter oligotrophus</i> (HE616165)	99
MZ1CEH1	1	Alphaproteobacteria no cultivada (HE614765)	Mina de arsénico y oro	99	<i>Pedomicrobium australicum</i> (X97693)	96
MZ1CEC2	1	Bacteria no cultivada (JN615656)	Biofilm en tubo de lava	92	<i>Dongia mobilis</i> (FJ455532)	92
MZ1CEC1	1	Bacteria no cultivada (FJ479209)	Pradera	99	<i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i>	96

Capítulo 5

Gammaproteobacteria						
MZ1CEB4	2	Bacteria no cultivada (DQ823219)	Monumento Nacional Cuevas de Oregón	99	<i>Lysobacter koreensis</i> (AB166878)	98
MZ1CED5	1	Bacteria no cultivada (DQ823219)	Monumento Nacional Cuevas de Oregón	99	<i>Lysobacter koreensis</i> (AB166878)	94
Deltaproteobacteria						
MZ1CED2	1	Bacteria no cultivada (JQ408038)	Aguas residuales	99	<i>Byssovorax cruenta</i> (AJ833647)	94
Acidobacteria						
MZ1CEF5	1	Bacteria no cultivada (AB661592)	Sedimento de un lago	98	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634)	94
Bacteroidetes						
MZ1CEA4	1	Bacteroidetes no cultivado (HG379869)	Pinturas murales en tumbas etruscas	97	<i>Flavitalea populi</i> (HM130561)	94

En el análisis matemático de la distribución de las secuencias de los clones, las curvas de rarefacción obtenidas a nivel de especie y de género, 97% y 95% de similitud respectivamente, no llegaron a alcanzar la asíntota, aunque la función de género ya mostraba signos de tendencia hacia la estabilidad. A nivel de filo, 80% de similitud, la curva de rarefacción sí alcanzó la fase estacionaria (Figura 5.6).

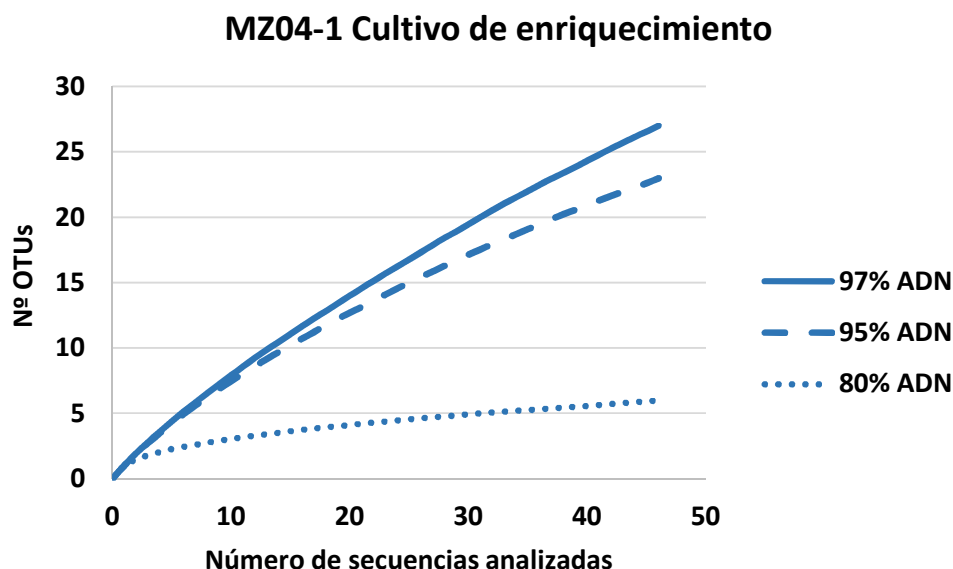


Figura 5.6 Curvas de rarefacción de los cultivos de enriquecimiento de la muestra MZ04-1. Se representa el número de secuencias analizadas frente al número de OTUs generados a tres niveles de similitud: especie (97%), género (95%) y filo (80%). Genoteca de ADN (—).

Aunque la riqueza a nivel de especie y de género no alcanzó totalmente la fase de saturación, la pendiente de estas curvas indicó una cobertura de la biodiversidad que permitía efectuar el análisis estadístico con las secuencias obtenidas.

➤ Estudio de las comunidades bacterianas de la muestra natural MZ04-1 mediante la construcción de una genoteca de ADN

Con el objetivo inicial de analizar los microorganismos presentes totales y metabólicamente activos de los depósitos orgánicos pastosos de color negro de la Cueva del Llano de los Caños, se llevó a cabo la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra natural MZ04-1. La amplificación mediante PCR resultó negativa para el ADNc, por lo que únicamente se pudo proceder con el estudio de la comunidad total de bacterias de dicha muestra. La genoteca de ADN fue elaborada con 93 secuencias libres de quimeras.

La distribución de los diferentes filos en la muestra puede observarse en la Figura 5.7. Proteobacteria fue el más abundante, abarcando un 28% de las secuencias obtenidas, distribuidas entre Gammaproteobacteria, que alcanzó un 13%,

Alphaproteobacteria con un 11% y Betaproteobacteria y Deltaproteobacteria con un 2% cada una.

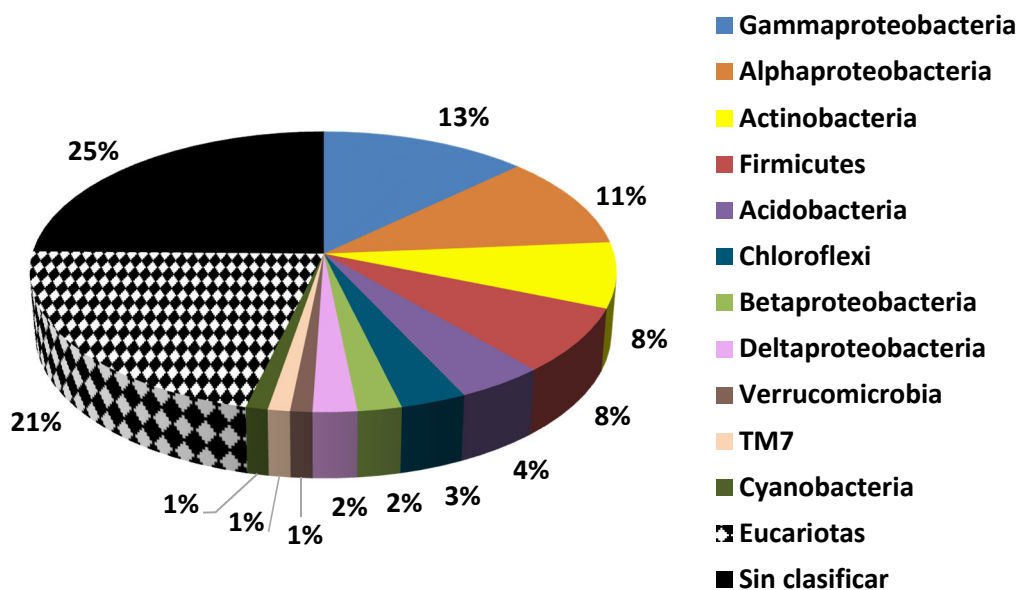


Figura 5.7 Distribución de las secuencias de la genoteca de ADN correspondiente a la muestra natural de depósitos orgánicos negros MZ04-1 de la Cueva del Llano de los Caños.

Los filos Actinobacteria y Firmicutes tuvieron asimismo una buena representación, con un 8% cada uno, seguidos de Acidobacteria y Chloroflexi con un 4% y 3%, respectivamente. Verrucomicrobia, Cyanobacteria y la división candidata TM7 fueron los menos detectados en la muestra natural MZ04-1, con sólo un 3% del total.

Además, un porcentaje considerable de los clones de esta muestra, 25%, correspondió a bacterias sin clasificación, ya que su similitud fue menor del 80% (Eztacon), lo que no permitió su afiliación. Por último, el 21% del total de secuencias quedó asignado a identificaciones de naturaleza no bacteriana, concretamente a cloroplastos y mitocondrias de algas y pinos, usando los cebadores específicos de bacterias.

Las 93 secuencias correspondientes a las bacterias totales de la muestra MZ04-1 se distribuyeron en 82 OTUs (Tabla 5.3).

La clase Gammaproteobacteria estuvo representada por una amplia variedad de secuencias, de las que únicamente se pudieron identificar de acuerdo con una similitud superior al 97% *Acinetobacter schindleri*, *Pseudomonas indica* y *Moraxella osloensis*. Dentro de Alphaproteobacteria, las especies representativas fueron *Hyphomicrobium facile* subsp. *tolerans*, *Phyllobacterium myrsinacearum* y *Aminobacter anthyllidis*. Las clases menos detectadas del filo Proteobacteria fueron Betaproteobacteria y Deltaproteobacteria, con secuencias entre el 80 y 90%, lo que impide su afiliación a géneros.

Las especies afiliadas a Actinobacteria correspondieron a *Propionibacterium acnes* y *Gaiella occulta*. La única especie identificable del filo Firmicutes fue *Bacillus thuringiensis*. El resto de los filos presentaron secuencias con similitudes de entre el 80 y 90%, lo que indica que pudieran tratarse de especies nuevas.

La Tabla 5.3 también incluye las 20 secuencias de esta muestra que estuvieron afiliadas a los géneros eucariotas de *Pinus* y *Klebsormidium*, mostrando similitudes muy altas tanto con las mitocondrias como con los cloroplastos de estos organismos.

También se efectuó un análisis de las secuencias obtenidas de la muestra natural de depósitos orgánicos negros de la Cueva del Llano de los Caños y sus identificaciones según su procedencia, atendiendo a los datos del NCBI (Tabla 5.3).

La procedencia de bacterias más representada en esta muestra, con un 11,8% del total, correspondió a musgos acuáticos. Un 7,5% del total se asignó a bacterias de biofilms microbianos presentes en tubos de lava, otro 7,5% a bacterias del suelo de una pradera y un 5,4% a bacterias de sedimentos subterráneos.

Un grupo de bacterias procedió de otras clases de suelos, alcanzando una buena representación con el 22,6% del total. Los más frecuentes fueron un suelo geotérmico de la Antártida (4,3%), suelo de rizosfera (4,3%), suelo de un arrozal (3,2%), suelo agrícola (2,2%) y suelo de un invernadero (2,2%), entre otros. El 7,6% correspondió a bacterias de sedimentos subterráneos, sedimentos arenosos y sedimentos de un río. Un 4,3% se atribuyó a bacterias procedentes de rocas como la limonita, la dunita y la microbialita, mientras que un 2,2% correspondió a bacterias de espeleotemas de tipo moonmilk de las cuevas calizas italianas “Grotta della Foos” y “Bus della Genziana”, así como a biofilms negros de ferromanganeso localizados en la Cueva de Altamira.

El 31,1% restante correspondió a las procedencias de los eucariotas detectados, cloroplastos y mitocondrias de diferentes especies de pinos y algas, así como a las procedencias bacterianas menos representadas (Tabla 5.3).

Tabla 5.3 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias totales obtenidas de la muestra MZ04-1 (93 secuencias, 82 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Gammaproteobacteria						
MZ1MNDK36	1	Bacteria no cultivada (GU293202)	Estómago de pez gato	92	<i>Thioalkalivibrio halophilus</i> (AY346464)	81
MZ1MNDK76	1	<i>Pseudomonas</i> sp. (FJ711216)	Cavernas Kartchner	99	<i>Pseudomonas indica</i> (AF302795)	97
MZ1MNDK12	1	Bacteria no cultivada (JF167620)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	92	<i>Aquicella siphonis</i> (AY359283)	91
MZ1MNDK48	1	Bacteria no cultivada (EU134708)	Suelo de una pradera	90	<i>Aquicella siphonis</i> (AY359283)	86
MZ1MNDK47	1	Bacteria no cultivada (EU134708)	Suelo de una pradera	90	<i>Aquicella siphonis</i> (AY359283)	85
MZ1MNDK61	1	Bacteria no cultivada (EU134708)	Suelo de una pradera	90	<i>Aquicella siphonis</i> (AY359283)	86
MZ1MNDK51	1	Bacteria no cultivada (HQ218590)	Suelo contaminado	94	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i> (AM418384)	93
MZ1MNDK81	1	Bacteria no cultivada (JF225674)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	99	<i>Moraxella osloensis</i> (X74897)	100
MZ1MNDK86	1	<i>Acinetobacter schindleri</i> (KC934833)	Limolita púrpura	97	<i>Acinetobacter schindleri</i> (APPQ01000011)	97
MZ1MNDK45	1	<i>Acinetobacter schindleri</i> (KC934833)	Limolita púrpura	99	<i>Acinetobacter schindleri</i> (APPQ01000011)	99
MZ1MNDK108	1	Bacteria no cultivada (JN672480)	Biofilm en tubo de lava	94	<i>Thiorhodospira sibirica</i> (AGFD01000020)	81
MZ1MNDK83	1	Gammaproteobacteria no cultivada (CU927839)	Aguas residuales	96	<i>Legionella brunensis</i> (Z32636)	89
Alphaproteobacteria						
MZ1MNDK5	1	Bacteria no cultivada (GU293202)	Estómago de pez gato	91	<i>Lacibacterium aquatile</i> (HE795994)	82
MZ1MNDK68	1	Bacteria no cultivada (HQ143912)	Microbialita	99	Candidatus <i>Sphaeronema italicum</i> (AY428765)	90
MZ1MNDK54	1	Bacteria no cultivada (JN671983)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Hyphomicrobium facile</i> subsp. <i>tolerans</i> (Y14311)	97
MZ1MNDK104	1	Bacteria no cultivada (JN671992)	Biofilm en tubo de lava	94	<i>Hyphomicrobium facile</i> subsp. <i>tolerans</i> (Y14311)	94
MZ1MNDK123	1	Bacteria no cultivada (JN671992)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Hyphomicrobium facile</i> subsp. <i>tolerans</i> (Y14311)	95
MZ1MNDK85	1	<i>Phyllobacterium</i> sp. (AM989040)	Agua potable tratada	98	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> (D12789)	98
MZ1MNDK63	1	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> (FN908781)	Rizosfera	98	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> (D12789)	98
MZ1MNDK27	1	<i>Aminobacter aminovorans</i> (NR_025301)	Suelos enriquecidos con aminos	98	<i>Aminobacter anthyllidis</i> (FR869633)	98
MZ1MNDK43	1	Bacteria no cultivada (JX221903)	Sedimento subterráneo	95	<i>Caedibacter caryophilus</i> (X71837)	90
MZ1MNDK39	1	Bacteria no cultivada (HQ916528)	Volcán de lodo	97	<i>Nisaea denitrificans</i> (AUFM01000008)	87
Actinobacteria						
MZ1MNDK67	1	Bacteria no cultivada (JF130561)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	100	<i>Propionibacterium acnes</i> (AWZZ01000008)	100

MZ1MNDK94	1	Bacteria no cultivada (EU490273)	Suelo de la Antártida	87	<i>Streptomyces catbensis</i> (AB705486)	87
MZ1MNDK40	1	Bacteria no cultivada (EU490273)	Suelo de la Antártida	88	<i>Streptomyces catbensis</i> (AB705486)	87
MZ1MNDK113	1	Bacteria no cultivada (EU490273)	Suelo de la Antártida	88	<i>Streptomyces catbensis</i> (AB705486)	88
MZ1MNDK127	1	Bacteria no cultivada (EU490273)	Suelo de la Antártida	85	<i>Streptomyces catbensis</i> (AB705486)	83
MZ1MNDK91	1	Bacteria no cultivada (KJ782245)	Suelo de rizosfera	97	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	97
MZ1MNDK	1	Bacteria no cultivada (EU132645)	Suelo de pradera	86	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	94
Firmicutes						
MZ1MNDK26	1	Bacteria no cultivada (HM186978)	Sedimento subterráneo	99	<i>Ammonifex thiophilus</i> (EF554597)	83
MZ1MNDK18	1	Bacteria no cultivada (FR871594)	Suelo de invernadero	99	<i>Ammonifex thiophilus</i> (EF554597)	83
MZ1MNDK65	1	Bacteria no cultivada (HM186978)	Sedimento subterráneo	99	<i>Ammonifex thiophilus</i> (EF554597)	84
MZ1MNDK29	1	Bacteria no cultivada (FR871594)	Suelo de invernadero	99	<i>Fervidicola ferrireducens</i> (EU443728)	83
MZ1MNDK3	1	Bacteria no cultivada (AY754839)	Sedimento de un río	98	<i>Thermolithobacter ferrireducens</i> (AF282253)	82
MZ1MNDK79	1	<i>Bacillus thuringiensis</i> (KT354273)	Agua potable tratada	99	<i>Bacillus thuringiensis</i> (ACNF01000156)	98
MZ1MNDK50	1	Bacteria no cultivada (KJ817553)	Suelo	90	<i>Polycladomyces abyssicola</i> (AB688114)	80
Acidobacteria						
MZ1MNDK34	1	Bacteria no cultivada (HQ397492)	Suelo agrícola	97	<i>Geothrix fermentans</i> (AUAU01000012)	84
MZ1MNDK32	1	Bacteria no cultivada (HE576378)	Fluido de metalurgia	99	<i>Holophaga foetida</i> (AGSB01000040)	83
MZ1MNDK93	1	Bacteria no cultivada (HQ397492)	Suelo agrícola	95	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	83
MZ1MNDK88	1	Acidobacteria no cultivada (HQ597632)	Suelo de pradera	98	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	84
Chloroflexi						
MZ1MNDK52	1	Bacteria no cultivada (JF266129)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Bellilinea caldifistulae</i> (AB243672)	86
MZ1MNDK49	1	Bacteria no cultivada (JF266129)	Biofilm en tubo de lava	96	<i>Bellilinea caldifistulae</i> (AB243672)	83
MZ1MNDK11	1	Bacteria no cultivada (HM186429)	Sedimento subterráneo	94	<i>Ornatilinea apprima</i> (JQ292916)	85
Betaproteobacteria						
MZ1MND13	1	Betaproteobacteria no cultivada (HE604299)	Biofilm negro de ferromanganeso	98	<i>Thiobacter subterraneus</i> (AB180657)	90
MZ1MND23	1	Bacteria no cultivada (KF712626)	Suelo de pradera	99	<i>Derxia gummosa</i> (AB089482)	91
Deltaproteobacteria						
MZ1MND17	1	Bacteria no cultivada (AB630668)	Musgo acuático	93	<i>Hippea maritima</i> (CP002606)	80
MZ1MND58	1	Bacteria no cultivada (AB630668)	Musgo acuático	93	<i>Hippea maritima</i> (CP002606)	80
Cyanobacteria						
MZ1MND89	1	Bacteria no cultivada (JN701179)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Aphanocapsa muscicola</i> (FR798916)	80

Capítulo 5

Verrucomicrobia

MZ1MND129	1	Verrucomicrobia no cultivada (EU043541)	Dunas	96	<i>Terrimicrobium sacchariphilum</i> (GU129926)	85
-----------	---	---	-------	----	---	----

TM7

MZ1MND111	1	Bacteria no cultivada (AM158375)	Rizosfera	93	Candidatus <i>Saccharimonas aalborgensis</i> (CP005957)	86
-----------	---	----------------------------------	-----------	----	---	----

Eucariotas*¹

MZ1MNDK84	4	<i>Pinus bungeana</i> (EU796223)	Mitocondria de pino	99	(Mitocondria) <i>Pinus strobus</i> (AF058659)	99
MZ1MNDK70	3	<i>Pinus taiwanensis</i> (KP771703)	Cloroplasto de pino	99	(Cloroplasto) <i>Pinus thunbergii</i> (D17510)	100
MZ1MNDK19	1	<i>Pinus taiwanensis</i> (KP771703)	Cloroplasto de pino	99	(Cloroplasto) <i>Pinus thunbergii</i> (D17510)	99
MZ1MNDK74	1	<i>Pinus bungeana</i> (EU796223)	Mitocondria de pino	99	(Mitocondria) <i>Pinus strobus</i> (AF058659)	98
MZ1MNDK64	1	<i>Pinus bungeana</i> (EU796223)	Mitocondria de pino	94	(Mitocondria) <i>Pinus strobus</i> (AF058659)	97
MZ1MNDK14	1	<i>Pinus bungeana</i> (EU796223)	Mitocondria de pino	99	(Mitocondria) <i>Pinus strobus</i> (AF058659)	98
MZ1MNDK73	1	<i>Pinus</i> sp. (DQ008721)	Mitocondria de pino	99	(Mitocondria) <i>Pinus strobus</i> (AF058659)	99
MZ1MNDK71	1	<i>Pinus taiwanensis</i> (KP771703)	Cloroplasto de pino	99	(Cloroplasto) <i>Pinus thunbergii</i> (D17510)	99
MZ1MNDK95	1	<i>Klebsormidium flaccidum</i> (KJ461680)	Cloroplasto de alga	99	(Cloroplasto) <i>Klebsormidium flaccidum</i> (AF393598)	100
MZ1MNDK24	1	<i>Pinus taiwanensis</i> (KP771703)	Cloroplasto de pino	99	(Cloroplasto) <i>Pinus thunbergii</i> (D17510)	100
MZ1MNDK80	1	<i>Klebsormidium flaccidum</i> (KJ461680)	Cloroplasto de alga	99	(Cloroplasto) <i>Klebsormidium flaccidum</i> (AF393598)	100
MZ1MNDK99	1	<i>Pinus taiwanensis</i> (KP771703)	Cloroplasto de pino	99	(Cloroplasto) <i>Pinus thunbergii</i> (D17510)	98
MZ1MNDK102	1	<i>Pinus bungeana</i> (EU796223)	Mitocondria de pino	96	(Mitocondria) <i>Pinus strobus</i> (AF058659)	86
MZ1MNDK110	1	<i>Pinus massoniana</i> (DQ478790)	Cloroplasto de pino	89	(Cloroplasto) <i>Pinus massoniana</i> (DQ478790)	85
MZ1MNDK116	1	<i>Pinus tabuliformis</i> (KT740995)	Cloroplasto de pino	89	(Cloroplasto) <i>Pinus thunbergii</i> (D17510)	87

Bacterias sin clasificar*²

MZ1MNDK72	5	Bacteria no cultivada (AB630668)	Musgo acuático	93	-	-
MZ1MNDK44	3	Bacteria no cultivada (AB660874)	Suelo de arrozal	83	-	-
MZ1MNDK92	1	Bacteria no cultivada (AM991209)	Manantial kárstico	69	-	-
MZ1MNDK66	1	Bacteria no cultivada (FJ949446)	Sedimento arenoso	91	-	-
MZ1MNDK53	1	Bacteria no cultivada (JN697821)	Raíz del arroz	93	-	-
MZ1MNDK1	1	Bacteria no cultivada (AB630668)	Musgo acuático	91	-	-
MZ1MNDK69	1	Bacteria no cultivada (KC255360)	Moonmilk	88	-	-
MZ1MNDK75	1	Bacteria no cultivada (AB630668)	Musgo acuático	92	-	-
MZ1MNDK20	1	Bacteria no cultivada (AB630668)	Musgo acuático	93	-	-
MZ1MNDK2	1	Bacteria no cultivada (EU135363)	Suelo de pradera	95	-	-

Tubos de lava de La Palma y Gran Canaria (Islas Canarias, España)

MZ1MNDK57	1	Bacteria no cultivada (HM187259)	Sedimento subterráneo	98	-	-
MZ1MNDK55	1	Bacteria no cultivada (AB630668)	Musgo acuático	93	-	-
MZ1MNDK103	1	Alfaproteobacteria no cultivada (JN003139)	Dunita serpentizada	88	-	-
MZ1MNDK100	1	Bacteria no cultivada (KF106313)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	93	-	-
MZ1MNDK106	1	Bacteria no cultivada (FR871594)	Suelo de invernadero	91	-	-
MZ1MNDK121	1	Bacteria no cultivada (KC563024)	Suelo	97	-	-
MZ1MNDK119	1	Chloroflexi no cultivado (JX859933)	Permafrost	90	-	-

*¹ Eucariotas detectados con cebadores específicos de bacterias.

*² No fue posible clasificar los OTUs con un porcentaje de similitud menor del 80% (EZtaxon), por lo que no se especifica la especie cultivada más cercana.

En el análisis matemático de la distribución de las secuencias de los clones, las curvas de rarefacción obtenidas a nivel de especie, 97% de similitud, y de género, 95% de similitud, no llegaron a alcanzar la asíntota, siendo únicamente la obtenida a nivel de filo, 80% de similitud, la que ya comenzaba a mostrar aproximación a la saturación (Figura 5.8).

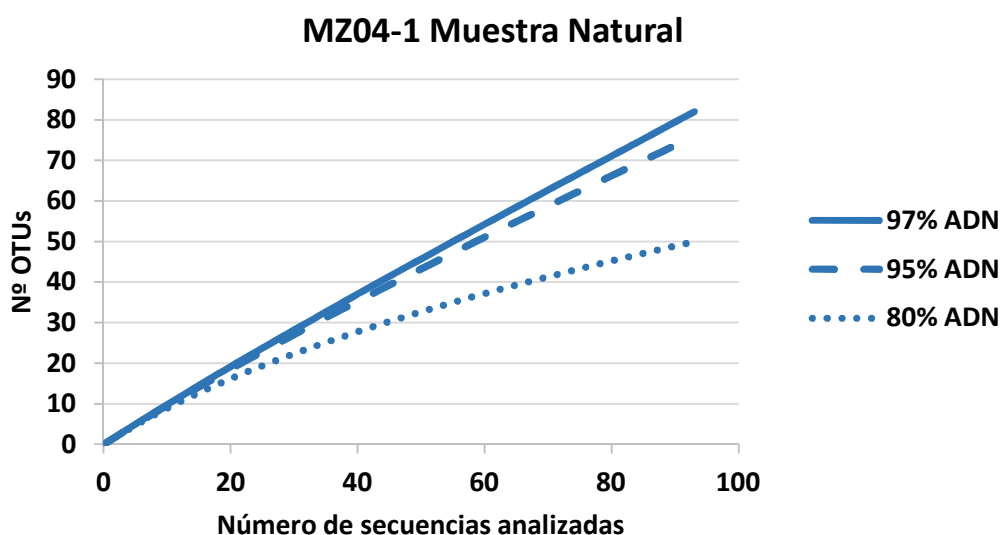


Figura 5.8 Curvas de rarefacción de la muestra natural MZ04-1. Se representa el número de secuencias analizadas frente al número de OTUs generados a tres niveles de similitud: especie (97%), género (95%) y filo (80%). Genoteca de ADN (—).

Estos resultados demostraron que la muestra de depósitos orgánicos negros de la Cueva del Llano de los Caños presentaba una amplia diversidad de comunidades bacterianas. Los OTUs estaban muy distantes taxonómicamente ya que, como se aprecia en la Tabla 5.3, correspondían a bacterias bastante diferentes, con la ausencia de grupos taxonómicos especialmente mayoritarios, habiéndose detectado 15 OTUs de cloroplastos y mitocondrias de eucariotas con cebadores de bacterias. No resultó de interés repetir el proceso de clonación teniendo en cuenta el bajo contenido en ácidos nucleicos de la muestra, con PCRs que inicialmente no amplificaron el ADN y sin resultados positivos para el ADNc. En el caso del ADN, únicamente tras varios intentos se consiguieron algunas bandas débiles. A tenor de estos resultados, resultaría factible afirmar que la cantidad de bacterias en la muestra era escasa, aunque asignable a grupos muy diversos.

Por último, hay que señalar que también se realizó la amplificación de las muestras de depósitos orgánicos negros de la Cueva del Llano de los Caños utilizando cebadores específicos de arqueas y hongos con resultados negativos.

➤ **Caracterización morfológica**

Las observaciones al microscopio electrónico de barrido (FESEM) de la muestra MZ04-1 revelaron muchos agregados minerales ricos en hierro, además de algunas células bacterianas mineralizadas con forma bacilar y cocoide (Figura 5.9 A y B). También fue posible localizar filamentos reticulados en esta muestra (Figura 5.9 C y D), la mayor parte de ellos mineralizados.

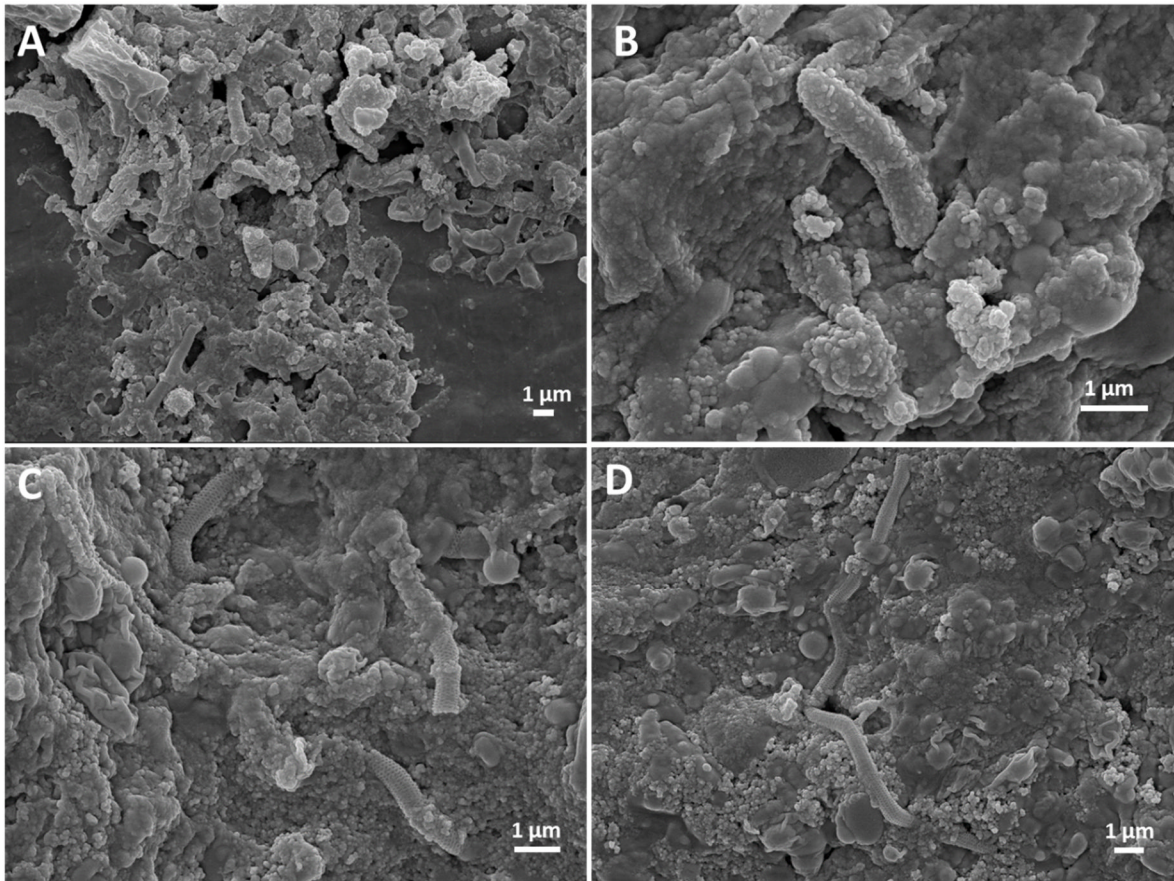


Figura 5.9. Imágenes FESEM de la muestra MZ04-1. A. Agregados minerales ricos en hierro, asociados a bacilos y cocos mineralizados. B. Detalle de una célula bacilar mineralizada, visible entre los depósitos minerales. C. Algunos filamentos reticulados de corta longitud. D. Filamento reticulado junto a células cocoides.

5.3.2 MUESTRAS DE MUCOLITOS MZ04-4 Y MZ04-5 (LA PALMA)

➤ Bacterias cultivadas

Las muestras MZ04-4 y MZ04-5 de la Cueva del Llano de los Caños de la isla de La Palma presentaron poco crecimiento en los medios de cultivo en placa, al igual que en el caso de la muestra de depósitos orgánicos negros MZ04-1. Se aislaron 21 cepas bacterianas en total, agrupadas en 10 especies diferentes.

La Tabla 5.4 recoge las identificaciones de los aislamientos, mostrándose las especies filogenéticamente más próximas disponibles en la base de datos Ez-Taxon.

Es preciso mencionar que al tratarse de muestras de la misma naturaleza y con gran cercanía de sus respectivos puntos de muestreo, los aislamientos obtenidos de la muestra MZ04-4 fueron muy similares a los de la muestra MZ04-5, motivo por el que las secuencias del gen del ARNr 16S de los mismos se trataron conjuntamente.

La mayoría de las bacterias aisladas, 17 secuencias correspondientes al 81% del total, estuvieron afiliadas a Actinobacteria. El filo Firmicutes representó el 14,3%, abarcando a tres secuencias, y la clase Gammaproteobacteria fue la menos aislada con únicamente una secuencia (4,7%).

Más de un 80% de las bacterias obtenidas se afiliaron a los géneros *Streptomyces* (57%), *Rhodococcus* (14,3%), pertenecientes al filo Actinobacteria, y *Bacillus* (9,5%), perteneciente al filo Firmicutes (Tabla 5.4).

Además, se aisló una única especie de los géneros *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus* y *Acinetobacter*.

Respecto a su procedencia, un 47,6% de las cepas bacterianas más cercanas taxonómicamente a las aisladas de los mucolitos de la Cueva del Llano de los Caños no poseían una fuente de aislamiento específica. Teniendo esto en cuenta, las procedencias conocidas más frecuentes correspondieron a distintas clases de suelos (33,3%) y agua marina (14,3%).

Tabla 5.4 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas aisladas de las muestras MZ04-4 y MZ04-5.

Cepa	Nº de aislados*	Identificación molecular Ez Taxon (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)
Actinobacteria				
MZ045-M7-6	8	<i>Streptomyces gardneri</i> NBRC 12865 (AB249908)	No especificada	100
MZ045-Ay+Mn1	3	<i>Rhodococcus erythropolis</i> NBRC 100887 (AP008957)	Agua marina	100
MZ044-ROUF4	2	<i>Streptomyces xanthophaeus</i> NRRL B-5414 (JOFT01000080)	Suelo	100
MZ044-ROUF1	2	<i>Streptomyces cirratus</i> NRRL B-3250 (AY999794)	No especificada	100
MZ045-ROUF2	1	<i>Nocardia ignorata</i> DSM 44496 (AJ303008)	Laboratorio de Microbiología	100
MZ045-BNF1	1	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6 (CP001341)	Suelo	100
Firmicutes				
MZ044-Ay+Mn4	1	<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048 (ACMU01000002)	Suelo	100
MZ044-BNF1	1	<i>Paenibacillus frigoriresistens</i> YIM 016 (JQ314346)	Suelo	99
MZ045-Ay+Mn2	1	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 (AB363738)	Suelo árido cálido	95
Gammaproteobacteria				
MZ045-ROUF3	1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> DSM 30006 (AIEC01000170)	Suelo enriquecido con quinato	100

* Aislamientos que comparten una similitud $\geq 99\%$.

➤ **Cultivos de enriquecimiento**

Los cultivos de enriquecimiento de las muestras de mucolitos MZ04-4 y MZ04-5 en medios líquidos selectivos mostraron crecimiento visible tras un periodo de incubación de entre diez y quince días. De nuevo, el medio Rouf modificado fue el que mostró unos resultados más llamativos, ya que aunque el crecimiento no estuvo asociado con precipitados negros, sí se obtuvieron abundantes precipitados de color marrón (Figura 5.10).



Figura 5.10 Frascos con las muestras de mucolitos de la Cueva del Llano de los Caños sembradas en medio de cultivo Rouf modificado, mostrando turbidez y precipitados de color marrón en el fondo de los mismo. El frasco de la izquierda corresponde a la muestra MZ04-4 y el de la derecha a MZ04-5.

De dichos cultivos de enriquecimiento, se elaboraron genotecas de ADN, con el fin de detectar los microorganismos totales presentes en ellos. Al igual que con la muestra MZ04-1, esta decisión se tomó en base a los resultados de los análisis mediante DGGE del apartado 5.3.4.

Las genotecas de ADN de los cultivos de enriquecimiento de las muestras de mucolitos se elaboraron con un total de 48 secuencias libres de quimeras para MZ04-4 y de 46 en el caso de MZ04-5.

La distribución de los distintos filos en las muestras se presenta en la Figura 5.11, en la que queda patente la marcada diferencia existente entre las comunidades bacterianas de los cultivos de enriquecimiento de los mucolitos. El único filo en común correspondió a Firmicutes, teniendo en cuenta que a pesar de que fue el más abundante en el cultivo de la muestra MZ04-4, representando el 90% de las

secuencias (Figura 5.11 A), quedó relegado a únicamente un 4% en el cultivo de la muestra MZ04-5 (Figura 5.11 B).

En las Tablas 5.5 y 5.6 aparecen las identificaciones de las 94 secuencias obtenidas de los cultivos de enriquecimiento, distribuidas en 24 OTUs en total. El filo Firmicutes estuvo representado mayoritariamente por *Pelosinus fermentans* (62,8%) en el cultivo de enriquecimiento de MZ04-4. Por el contrario, en el de MZ04-5, al filo Firmicutes solamente se afilió una secuencia de la especie *Brevibacillus fluminis*.

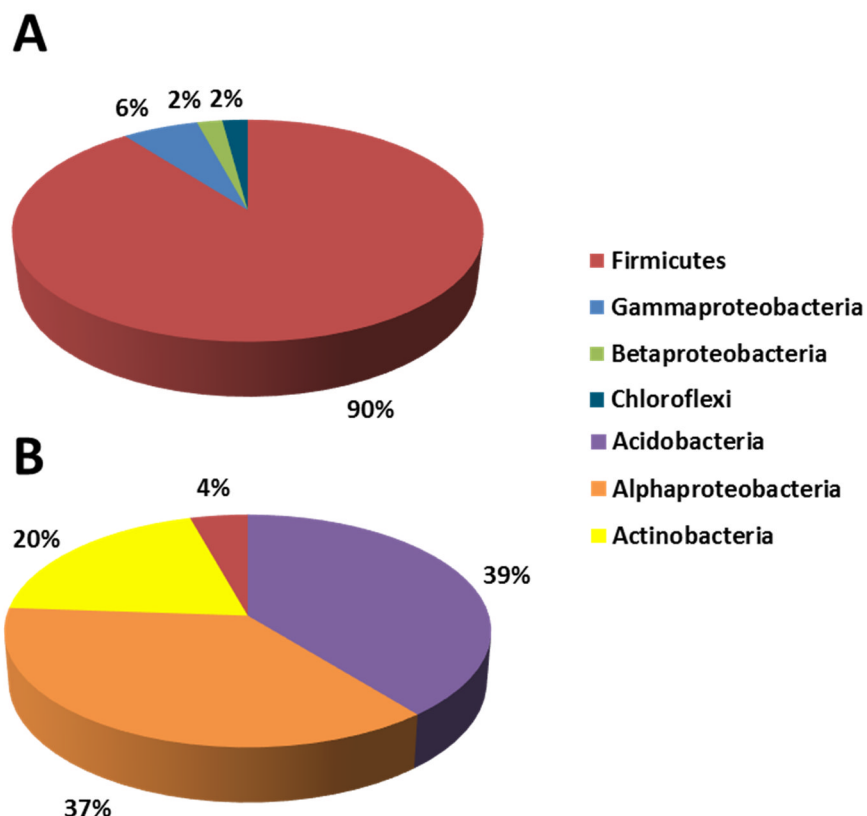


Figura 5.11 Distribución de filos en la muestra de cultivo de enriquecimiento en medio Rouf modificado de los mucolitos de la Cueva del Llano de los Caños. A. Genoteca de ADN del cultivo de MZ04-4. B. Genoteca de ADN del cultivo de MZ04-5.

En la muestra del cultivo de MZ04-4, el 10% restante de los clones se afilió a Proteobacteria, distribuidos en las clases Gammaproteobacteria (6%) y Betaproteobacteria (2%), con *Pseudomonas frederiksbergensis* y *Lysobacter koreensis* en la primera y *Polaromonas jejuensis* en la segunda (Figura 5.11 A, Tabla 5.5).

Los filos Acidobacteria y Proteobacteria, con la presencia de la clase Alphaproteobacteria exclusivamente, fueron los grupos taxonómicos mayoritarios en el cultivo de enriquecimiento de la muestra MZ04-5, abarcando más de tres cuartas partes de los clones totales obtenidos. En Alphaproteobacteria, se pudieron identificar con fiabilidad las especies *Phyllobacterium myrsinacearum*, *Phenylobacterium haematophilum*, *Aminobacter aminovorans* y *Afipia massiliensis*.

Además, todas las secuencias de Actinobacteria, correspondieron a la especie *Rhodococcus erythropolis* y las de Firmicutes a *Brevibacillus fluminis* (Figura 5.11 B, Tabla 5.6).

Por otra parte, las secuencias obtenidas de las muestras de los cultivos de enriquecimiento de los mucolitos de la Cueva del Llano de los Caños y sus identificaciones se analizaron según su procedencia teniendo en cuenta los datos del NCBI (Tablas 5.5 – 5.6), las cuales también fueron considerablemente distintas entre las dos muestras estudiadas.

En el cultivo de enriquecimiento de MZ04-4, el 83,3% del total correspondió a bacterias procedentes de sedimentos, un 8,3% a bacterias de suelos y un 2,1% a biofilms presentes en las paredes de tubos de lava. El 6,3% restante englobó a bacterias del intestino de un escarabajo y del agua mineral natural (Tabla 5.5).

En cuanto al cultivo de enriquecimiento de MZ04-5, prácticamente la mitad de las bacterias detectadas (47,8%) mostraron similitud con bacterias procedentes de ambientes relacionados con plantas. Entre estos ambientes se encuentran restos vegetales enterrados en el suelo, hoja de *Arabidopsis* sp. y la rizosfera. Un 39,1% correspondió a una bacteria no cultivada procedente de fluidos empleados en la industria metalúrgica como lubricantes de maquinaria. Un 10,9% se asignó a bacterias de suelos. Por último, el 2,2% lo representó una bacteria aislada de agua subterránea contaminada.

Tabla 5.5 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias totales obtenidas del cultivo de enriquecimiento en medio Rouf modificado de la muestra MZ04-4 (48 secuencias, 16 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Firmicutes						
MZ4CEK21	17	<i>Pelosinus</i> sp. (CP008852)	Sedimento no contaminado	99	<i>Pelosinus fermentans</i> (DQ145536)	98
MZ4CEK6	9	<i>Pelosinus</i> sp. (CP008852)	Sedimento no contaminado	99	<i>Pelosinus fermentans</i> (DQ145536)	98
MZ4CEK151	7	<i>Pelotomaculum</i> sp. no cultivado (JQ087074)	Sedimento de acuífero contaminado	97	<i>Pelotomaculum isophthalicum</i> (AB232785)	92
MZ4CEK161	2	<i>Bacillus</i> sp. (KM242582)	Intestino de escarabajo	99	<i>Bacillus toyonensis</i> (CP006863)	100
MZ4CEK162	1	<i>Pelotomaculum</i> sp. no cultivado (JQ087074)	Sedimento de acuífero contaminado	98	<i>Pelotomaculum isophthalicum</i> (AB232785)	92
MZ4CEK4	1	<i>Peptococcaceae</i> no cultivado (JQ086916)	Sedimento de acuífero contaminado	88	<i>Pelotomaculum isophthalicum</i> (AB232785)	84
MZ4CEK33	1	<i>Peptococcaceae</i> no cultivado (JQ086916)	Sedimento de acuífero contaminado	99	<i>Pelotomaculum isophthalicum</i> (AB232785)	91
MZ4CEK166	1	<i>Peptococcaceae</i> no cultivado (JQ086916)	Sedimento de acuífero contaminado	99	<i>Pelotomaculum isophthalicum</i> (AB232785)	92
MZ4CEK24	1	<i>Peptococcaceae</i> no cultivado (JQ086916)	Sedimento de acuífero contaminado	99	<i>Pelotomaculum schinkii</i> (X91169)	91
MZ4CEK145	1	<i>Peptococcaceae</i> no cultivado (JQ086916)	Sedimento de acuífero contaminado	99	<i>Pelotomaculum schinkii</i> (X91169)	91
MZ4CEK146	1	<i>Paenibacillus</i> sp. (HG794305)	Suelo bajo área militar	99	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (EU179327)	99
MZ4CEK93	1	<i>Pelosinus</i> sp. (CP008852)	Sedimento no contaminado	99	<i>Pelosinus fermentans</i> (DQ145536)	98
Gammaproteobacteria						
MZ4CEK159	2	<i>Pseudomonas</i> sp. (HM113671)	Suelo	99	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> (AJ249382)	99
MZ4CEK156	1	<i>Lysobacter koreensis</i> (NR_041014)	Suelo de campo de ginseng	99	<i>Lysobacter koreensis</i> (AB166878)	97
Betaproteobacteria						
MZ4CEK17	1	<i>Comamonadaceae</i> no cultivado (AF523013)	Agua mineral natural	99	<i>Polaromonas jejuensis</i> (EU030285)	97
Chloroflexi						
MZ4CEK136	1	Bacteria no cultivada (JF266129)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Ornatilinea apprima</i> (JQ292916)	86

Tabla 5.6 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias totales obtenidas del cultivo de enriquecimiento en medio Rouf modificado de la muestra MZ04-5 (46 secuencias, 8 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Acidobacteria						
MZ5CEG2	18	Bacteria no cultivada (HE576378)	Fluido de metalurgia	99	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	83
Alphaproteobacteria						
MZ5CEF4	9	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> (FN908781)	Rizosfera	99	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> (D12789)	99
MZ5CEF1	3	Bacteria no cultivada (JQ798450)	Restos vegetales enterrados en el suelo	99	<i>Phenyllobacterium haematophilum</i> (AJ244650)	99
MZ5CEG4	3	<i>Aminobacter aminovorans</i> (AF329835)	Muestra de suelo	99	<i>Aminobacter aminovorans</i> (AJ011759)	100
MZ5CEG5	1	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> (FN908781)	Rizosfera	91	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	94
MZ5CEG3	1	<i>Bradyrhizobiaceae bacterium</i> (AY429694)	Agua subterránea contaminada	97	<i>Afipia massiliensis</i>	97
Actinobacteria						
MZ5CEE4	9	<i>Rhodococcus</i> sp. (HG737358)	Hoja de <i>Arabidopsis</i> sp.	99	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (AP008957)	100
Firmicutes						
MZ5CED1	2	<i>Brevibacillus</i> sp. (AY072721)	Suelo tropical	99	<i>Brevibacillus fluminis</i> (EU375457)	97

El análisis matemático de la distribución de las secuencias de los clones, mostró que las curvas de rarefacción generadas a nivel de especie, 97% de similitud, no llegaron a alcanzar la asíntota en el caso del cultivo de enriquecimiento de la muestra MZ04-4. A nivel de género, 95% de similitud, la función ya tendía a la estabilidad y lograba alcanzarla a nivel de filo, 80% de similitud (Figura 5.12 A), por lo que las secuencias obtenidas se consideraron suficientes para caracterizar las comunidades bacterianas mayoritarias.

Las curvas generadas para el cultivo de enriquecimiento de la muestra MZ04-5 sí alcanzaron la asíntota a todos los niveles con el número de secuencias analizadas (Figura 5.12 B), lo que indicó una muy buena cobertura de la biodiversidad bacteriana de la muestra estudiada.

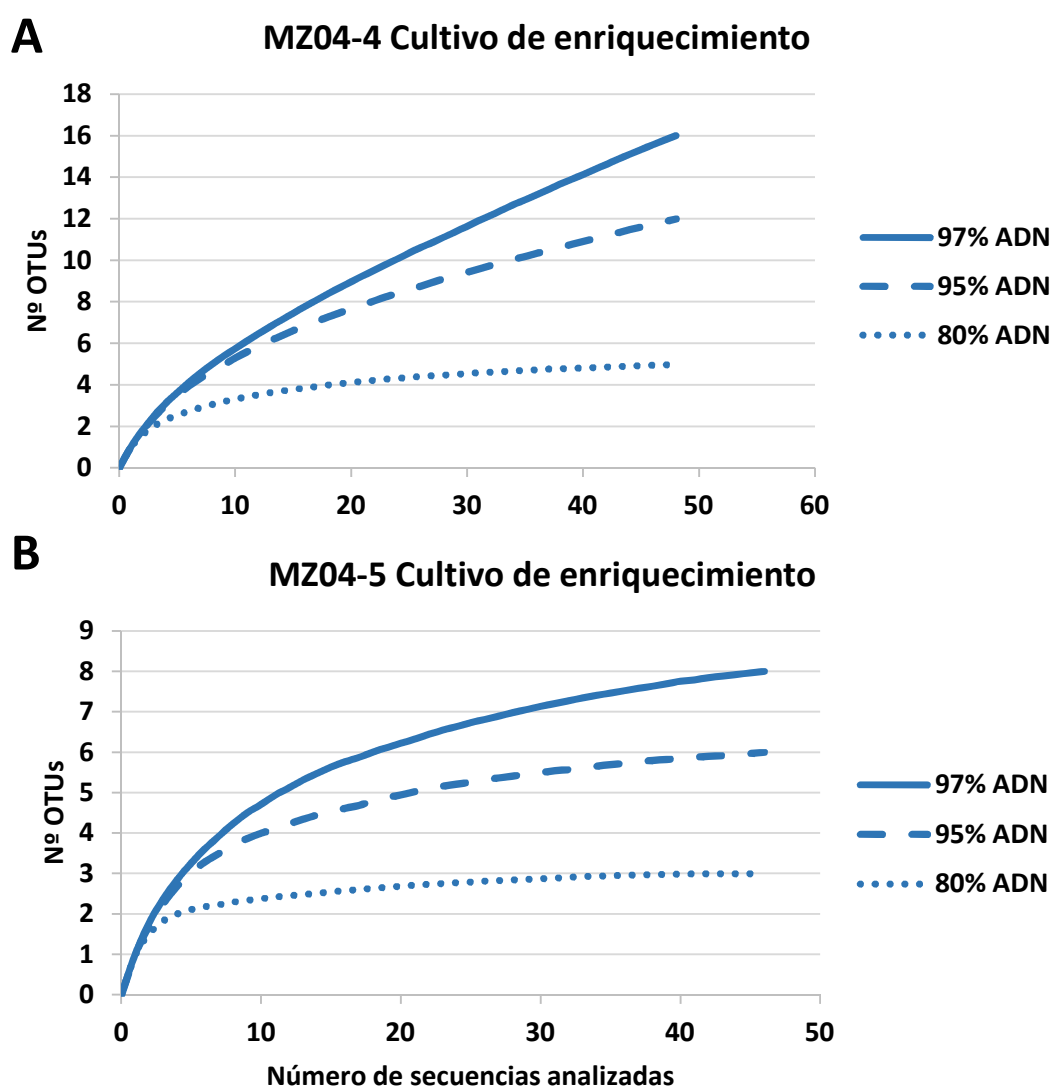


Figura 5.12 Curvas de rarefacción de los cultivos de enriquecimiento de las muestras de mucolitos de la Cueva del Llano de los Caños. A. Muestra MZ04-4. B. Muestra MZ04-5. Se representa el número de secuencias analizadas frente al número de OTUs generados a tres niveles de similitud: especie (97%), género (95%) y filo (80%). Genoteca de ADN (—).

➤ **Estudio de las comunidades bacterianas de las muestras naturales MZ04-4 y MZ04-5 mediante la construcción de genotecas de ARN**

Al igual que con la muestra de depósitos orgánicos negros MZ04-1, el objetivo inicial fue analizar los microorganismos presentes totales y metabólicamente activos de los mucolitos de la Cueva del Llano de los Caños. Sin embargo, a pesar de que la extracción de los ácidos nucleicos de las muestras MZ04-4 y MZ04-5 se llevó a cabo en diversas ocasiones, con modificaciones del protocolo para mejorar el rendimiento, las amplificaciones por PCR siempre resultaron negativas para el ADN y mostraron bandas leves para el ADNc. Este hecho únicamente permitió el estudio de la comunidad metabólicamente activa de bacterias. Se obtuvieron un total de 139 secuencias libres de quimeras de ambas muestras naturales de mucolitos de la Cueva del Llano de los Caños, con las que se elaboraron dos genotecas de ADNc, equivalente al ARN, una para MZ04-4 y otra para MZ04-5.

La distribución de los diferentes filos microbianos en las muestras objeto de estudio puede observarse en la Figura 5.13. En esta ocasión, sí existió una alta afinidad entre los filos presentes en las mismas, al contrario de lo ocurrido con los cultivos de enriquecimiento, de manera que las mayores diferencias se centraron en los grupos taxonómicos menos representados.

La mayoría de los clones bacterianos analizados se incluyeron en el filo Proteobacteria (63% en MZ04-4 y 79% en MZ04-5), distribuido en las clases Alpha-, Beta-, Gamma- y Deltaproteobacteria en la muestra MZ04-4 y solamente en Alpha- y Betaproteobacteria en MZ04-5. Alphaproteobacteria fue la clase predominante en ambas muestras, alcanzando un 42% en MZ04-4 y un 60% en MZ04-5. Betaproteobacteria presentó un porcentaje similar en los dos mucolitos, del 14% y 19%, convirtiéndose en el segundo grupo taxonómico más frecuente en MZ04-5 y siendo solamente superada por el filo Actinobacteria en MZ04-4. Además, las clases Gamma- y Deltaproteobacteria abarcaron un 7% del total en MZ04-4.

El filo Actinobacteria también estuvo bien representado en las muestras MZ04-4 y MZ04-5, con un 15% y 11% del total, respectivamente. Por otra parte, Firmicutes alcanzó el 11% en MZ04-4 y únicamente el 4% en MZ04-5 (Figura 5.13 A y B).

Los filos minoritarios de la muestra MZ04-4 correspondieron a Armatimonadetes (2%), Planctomycetes (2%), Chloroflexi (1%) y Bacteroidetes (1%). En MZ04-5, los menos representados fueron Gemmatimonadetes (2%) y de nuevo Armatimonadetes (2%). Por último, un 5% correspondió a bacterias que no pudieron ser clasificadas en MZ04-4, mientras que este porcentaje se vio reducido al 2% en el mucolito MZ04-5.

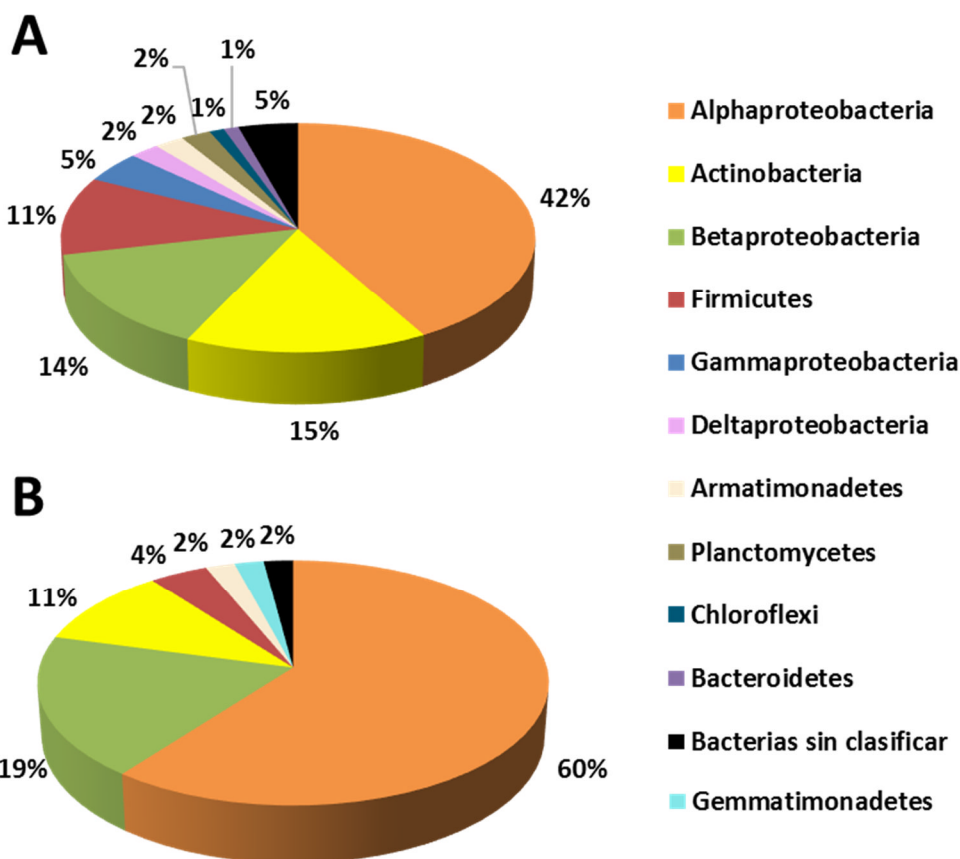


Figura 5.13 Distribución de filos en las muestras de mucolitos de la Cueva del Llano de los Caños. A. Genoteca de ARN de MZ04-4. B. Genoteca de ARN de MZ04-5.

Las identificaciones de las 139 secuencias obtenidas de las muestras MZ04-4 y MZ04-5 se presentan en las Tablas 5.7 y 5.8. Las secuencias correspondientes a las bacterias metabólicamente activas se distribuyeron en 56 OTUs para la muestra MZ04-4 (Tabla 5.7), y en 29 OTUs para MZ04-5 (Tabla 5.8). Muchas especies bacterianas estuvieron presentes en ambas muestras de mucolitos, incluso con valores semejantes en términos de abundancia.

La clase Alphaproteobacteria estuvo representada por los géneros *Methylobacterium* (12,1% en MZ04-4 y 18,8% en MZ04-5), *Bradyrhizobium* (5,5% en MZ04-4 y 3,3% en MZ04-5) y *Afipia* (3,3% en MZ04-4 y 10,4% en MZ04-5), entre otros. En la muestra MZ04-4, también fue destacable *Sphingomonas* spp. (5,5% del total de secuencias).

Dentro de Betaproteobacteria tuvo una elevada representación la especie *Aquabacterium commune* en los dos mucolitos estudiados, abarcando el 4,4% del total de secuencias en MZ04-4 y el 12,5% en MZ04-5, siendo la más abundante de la clase en este último caso. Sin embargo, en MZ04-4 el género predominante fue *Cupriavidus* (5,5%). Además, la especie *Advenella kashmirensis* se detectó también en la comunidad metabólicamente activa de las dos muestras.

En MZ04-4, la clase Gammaproteobacteria presentó secuencias afiliadas a los géneros *Shigella*, *Luteimonas* y *Pseudomonas*.

Propionibacterium acnes fue la especie representativa del filo Actinobacteria, alcanzando un porcentaje similar y menor del 6% en ambos mucolitos. También se detectaron secuencias afiliadas a los géneros *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Geodermatophilus* y *Kocuria* en MZ04-4, y a *Smaragdicosoccus* y *Streptomyces* en MZ04-5.

Por otra parte, Firmicutes alcanzó mayores porcentajes en MZ04-4, siendo el género *Desulfosporosinus* el más detectado, abarcando el 5,5% del total de secuencias. El único género perteneciente a este filo compartido entre las dos muestras estudiadas fue *Clostridium*, con una sola secuencia afiliada en cada caso.

De los filos Armatimonadetes, Planctomycetes, Bacteroidetes, Chloroflexi y Gemmatimonadetes se detectaron solamente una o dos secuencias en cada muestra, según el caso, sin posible afiliación dado los bajos porcentajes de similitud (Tablas 5.7 y 5.8).

Las afiliaciones filogenéticas de los clones secuenciados de las muestras de mucolitos de la Cueva del Llano de los Caños mostraron similitudes con bacterias no cultivadas de una amplia variedad de procedencias (Tablas 5.7 y 5.8).

Respecto a la muestra MZ04-4, el 23,1% del total correspondió a bacterias procedentes de entornos vegetales, como semillas, néctar floral y raíces de plantas, un 15,4% a bacterias de lagos, aguas marinas, potables y ambientes húmedos, otro 15,4% a bacterias de la piel humana y un 14,3% a bacterias de suelos. También se detectó un 5,5% de bacterias no cultivadas procedentes de ambientes subterráneos: la Cueva de Altamira, tumbas etruscas, además de biofilms en tubos de lava y otras cuevas. El resto de bacterias procedieron de fuentes de aislamiento menos representadas.

En la muestra MZ04-5, los ambientes relacionados con plantas volvieron a ser las procedencias más comunes de las bacterias similares a los clones secuenciados, con un 22,9% del total, porcentaje muy similar al que alcanzaron en MZ04-4. Las diferentes clases de aguas estuvieron de nuevo bien representadas, con un porcentaje del 14,6%. Los biofilms microbianos (10,4%), la piel humana (10,4%), los suelos y sedimentos (8,4%) y la Cueva de Altamira (3,3%) fueron otras fuentes de aislamiento frecuentes, al igual que en el anterior mucolito. El 30% restante correspondió a bacterias procedentes de hormigas y a los ambientes menos frecuentes.

Tabla 5.7 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias metabólicamente activas obtenidas de la muestra MZ04-4 (91 secuencias, 56 OTUs).

Clon repr. (nº acceso)	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Alphaproteobacteria						
MZ4MNK33	8	<i>Methylobacterium</i> sp. (AB673242)	Semillas de perilla	99	<i>Methylobacterium oryzae</i> (AY683045)	100
MZ4MNK103	5	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> (AB931155)	Nódulo de raíz	99	<i>Bradyrhizobium ganzhouense</i> (JQ796661)	100
MZ4MNK78	3	<i>Bradyrhizobium</i> sp. no cultivado (GQ129893)	Nave espacial	99	<i>Afipia massiliensis</i> (AY029562)	99
MZ4MNK110	3	Bacteria no cultivada (JX680715)	Muestra ambiental	99	<i>Caulobacter mirabilis</i> (AJ227774)	96
MZ4MNK1	3	<i>Sphingomonas</i> sp. (HF954436)	Suelo	100	<i>Sphingomonas echinoides</i> (JH584237)	100
MZ4MNK93	3	Bacteria no cultivada (EU133271)	Suelo con hierba	98	<i>Methylocapsa aurea</i> (FN433469)	96
MZ4MNK122	2	Bacteria no cultivada (GQ402822)	Suelo forestal	99	<i>Caulobacter mirabilis</i> (AJ227774)	96
MZ4MNK128	1	Alphaproteobacteria no cultivada (GQ390159)	Lago pobre en sulfatos	99	<i>Novosphingobium acidiphilum</i> (AUBA01000045)	98
MZ4MNK115	1	Bacteria no cultivada (HM312973)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	99	<i>Sphingomonas mali</i> (Y09638)	98
MZ4MNK55	1	Bacteria no cultivada (JQ629665)	Reactor con cloramina	99	<i>Phreatobacter oligotrophus</i> (HE616165)	94
MZ4MNK119	1	Bacteria no cultivada (EU133589)	Suelo con hierba	92	<i>Meganema perideroedes</i> (ARFG01000019)	91
MZ4MNK102	1	Bacteria no cultivada (KJ809477)	Micorriza arbuscular	99	<i>Methylobacterium rhodesianum</i> (AB175642)	100
MZ4MNK57	1	Bacteria no cultivada (KC432570)	Humedal	89	<i>Caulobacter mirabilis</i> (AJ227774)	86
MZ4MNK66	1	Bacteria no cultivada (JQ923803)	Agua potable	99	<i>Filomicrobium fusiforme</i> (Y14313)	96
MZ4MNK32	1	<i>Methylobacterium</i> sp. (HG937600)	Semillas de <i>Arabidopsis</i>	98	<i>Methylobacterium tardum</i> (AB252208)	96
MZ4MNK82	1	Alphaproteobacteria no cultivada (HF584616)	Pinturas murales en tubas etruscas	98	<i>Reyranella soli</i> (JX260424)	98
MZ4MNK91	1	Alphaproteobacteria no cultivada (EF188473)	Cueva de Altamira	99	<i>Methylobacterium persicinum</i> (AB252202)	100
MZ4MNK112	1	<i>Sphingomonas</i> sp. no cultivado (GQ129861)	Nave espacial	97	<i>Sphingomonas kyungheensis</i> (JN196137)	96
Actinobacteria						
MZ4MNK139	5	Bacteria no cultivada (JF171618)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	99	<i>Propionibacterium acnes</i> (AWZZ01000008)	100

Capítulo 5

MZ4MNK28	2	Bacteria no cultivada (HM257089)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	99	<i>Geodermatophilus terrae</i> (JN033773)	98
MZ4MNK136	1	Bacteria no cultivada (AM697331)	Polvo de interior	99	<i>Kocuria palustris</i> (Y16263)	99
MZ4MNK97	1	<i>Corynebacterium falsenii</i> (NR_121720)	No especificada	98	<i>Corynebacterium falsenii</i> (CP007156)	98
MZ4MNK39	1	Bacteria no cultivada (GQ011666)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	99	<i>Corynebacterium matruchotii</i> (ACSH01000013)	99
MZ4MNK140	1	<i>Microbacterium ginsengisoli</i> (FN668008)	Suelo	98	<i>Microbacterium ginsengisoli</i> (AB271048)	99
MZ4MNK76	1	Actinobacteria no cultivada (GQ203386)	Suelo de un bosque	98	<i>Actinoallomurus purpureus</i> (AB364588)	93
MZ4MNK77	1	Bacteria no cultivada (JN801136)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Pseudonocardia bannensis</i> (FJ817375)	95
MZ4MNK89	1	Bacteria no cultivada (JF122757)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	99	<i>Corynebacterium minutissimum</i> (X84679)	99
Betaproteobacteria						
MZ4MNK84	5	<i>Cupriavidus</i> sp. (KP226589)	Suelo de rizosfera	99	<i>Cupriavidus necator</i> (CP002878)	100
MZ4MNK11	2	Bacteria no cultivada (KC872879)	Agua marina superficial	99	<i>Aquabacterium commune</i> (AF035054)	98
MZ4MNK37	2	Bacteria no cultivada (KC872879)	Agua marina superficial	99	<i>Aquabacterium commune</i> (AF035054)	98
MZ4MNK63	2	<i>Advenella</i> sp. (KF740342)	Campo de ginseng	99	<i>Advenella kashmirensis</i> (AFQG01000022)	100
MZ4MNK30	1	<i>Burkholderia</i> sp. (JN872505)	Néctar floral	99	<i>Burkholderia caledonica</i> (BAYE01000050)	98
MZ4MNK10	1	Bacteria no cultivada (HM270419)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	97	<i>Duganella phyllosphaerae</i> (FR852575)	96
Firmicutes						
MZ4MNK60	2	<i>Desulfosporosinus meridiei</i> (CP003629)	Agua contaminada	99	<i>Desulfosporosinus auripigmenti</i> (AJ493051)	98
MZ4MNK143	2	Firmicutes no cultivado (AM713394)	Lago asociado a actividades mineras	97	<i>Desulfosporosinus lacus</i> (AJ582757)	92
MZ4MNK101	1	Bacteria no cultivada (AJ318164)	Biofiltro industrial	95	<i>Clostridium straminisolvens</i> (BAVR01000144)	92
MZ4MNK127	1	Firmicutes no cultivado (GQ342375)	Suelo contaminado	99	<i>Pelosinus fermentans</i> (DQ145536)	97
MZ4MNK75	1	Bacteria no cultivada (AM713394)	Lago asociado a actividades mineras	97	<i>Desulfosporosinus lacus</i> (AJ582757)	98
MZ4MNK29	1	<i>Clostridium aminobutyricum</i> (X76161)	No especificada	96	<i>Clostridium aminobutyricum</i> (X76161)	96
MZ4MNK81	1	Bacteria no cultivada (HM308303)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	94	<i>Syntrophomonas zehnderi</i> (DQ898277)	80
MZ4MNK100	1	Firmicutes no cultivado (JQ793519)	Suelo de rizosfera	94	<i>Paenibacillus ginsengihumi</i> (EF452662)	91
Gammaproteobacteria						
MZ4MNK130	1	<i>Escherichia</i> sp. no cultivado (FJ982869)	Residuos orgánicos	99	<i>Shigella flexneri</i> (X96963)	99
MZ4MNK138	1	Bacteria no cultivada (GQ263382)	Almacén de desechos	98	<i>Luteimonas mephitis</i> (AJ012228)	98

Tubos de lava de La Palma y Gran Canaria (Islas Canarias, España)

MZ4MKN117	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (HF584981)	Raíces de la vid	99	<i>Pseudomonas jessenii</i> (AF068259)	99
MZ4MKN71	1	Gammaproteobacteria no cultivada (JN541160)	Lodo activado	97	<i>Coxiella burnetii</i> (CP000890)	90
Deltaproteobacteria						
MZ4MKN64	1	Bacteria no cultivada (EF516279)	Suelo de pradera	95	<i>Labilithrix luteola</i> (AB847449)	95
MZ4MKN104	1	Bacteria no cultivada (HM558072)	Hongo de un jardín	98	<i>Desulfosoma profundum</i> (HM056226)	85
Armatimonadetes						
MZ4MKN111	2	Bacteria no cultivada (HM065762)	Glaciar rocoso	98	<i>Fimbriimonas ginsengisoli</i> (GQ339893)	90
Planctomycetes						
MZ4MKN108	1	Bacteria no cultivada (HE602791)	Biofilm de una cueva	97	<i>Gemmata obscuriglobus</i> (ABGO01000325)	94
MZ4MKN62	1	Planctomycete no cultivado (EU043877)	Dunas	93	<i>Zavarzinella formosa</i> (AM162406)	83
Chloroflexi						
MZ4MKN132	1	Bacteria no cultivada (HE653862)	Cueva	99	<i>Ornatilinea apprima</i> (JQ292916)	86
Bacteroidetes						
MZ4MKN5	1	Sphingobacteria no cultivada (EF520590)	Lago acidificado	96	<i>Alistipes shahii</i> (FP929032)	85
Bacterias sin clasificar*						
MZ4MKN34	1	Bacteria no cultivada (JF224439)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	80	-	-
MZ4MKN65	1	<i>Ralstonia</i> sp. (AB167178)	Quimiostato	88	-	-
MZ4MKN72	1	Bacteria no cultivada (JQ923558)	Agua potable	80	-	-
MZ4MKN59	1	Bacteria no cultivada (HM308303)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	88	-	-

*No fue posible clasificar los OTUs con un porcentaje de similitud menor del 80% (Eztaxon), por lo que no se especifica la especie cultivada más cercana.

Tabla 5.8 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias metabólicamente activas obtenidas de la muestra MZ04-5 (48 secuencias, 29 OTUs).

Clon repr. (nº acceso)	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Alphaproteobacteria						
MZ5MKN32	5	Alphaproteobacteria no cultivada (HM480263)	Biofilm microbiano hipersalino	99	<i>Caulobacter mirabilis</i> (AJ227774)	96
MZ5MKN56	4	<i>Bradyrhizobium</i> sp. no cultivado (GQ129893)	Nave espacial	99	<i>Afipia massiliensis</i> (AY029562)	99
MZ5MKN85	3	<i>Bradyrhizobium ganzhouense</i> (NR_133706)	Nódulos de <i>Acacia melanoxylon</i>	99	<i>Bradyrhizobium ganzhouense</i> (JQ796661)	100
MZ5MKN42	3	<i>Methylobacterium</i> sp. (AB673242)	Semilla de perilla	99	<i>Methylobacterium oryzae</i> (AY683045)	100
MZ5MKN30	2	Alphaproteobacteria no cultivada (EF188473)	Cueva de Altamira	99	<i>Methylobacterium persicinum</i> (AB252202)	100
MZ5MKN57	2	Bacteria no cultivada (KJ809477)	Micorriza arbuscular	99	<i>Methylobacterium rhodesianum</i> (AB175642)	100
MZ5MKN41	1	<i>Brucella</i> sp. no cultivada (JX098342)	Agua potable	91	<i>Phreatobacter oligotrophus</i> (HE616165)	85
MZ5MKN22	1	<i>Maricaulis</i> sp. no cultivado (JQ684441)	Agua potable	99	<i>Shinella granuli</i> (AY995149)	91
MZ5MKN69	1	Bacteria no cultivada (HM312973)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	99	<i>Afipia massiliensis</i> (AY029562)	98
MZ5MKN77	1	<i>Methylobacterium marchantiae</i> (KR811206)	Lago de agua dulce	99	<i>Methylobacterium marchantiae</i> (FJ157976)	100
MZ5MKN70	1	Bacteria no cultivada (GU118459)	Coral	92	<i>Caulobacter mirabilis</i> (AJ227774)	88
MZ5MKN83	1	Bacteria no cultivada (JX095150)	Intestino de vaca	88	<i>Caulobacter mirabilis</i> (AJ227774)	85
MZ5MKN66	1	<i>Methylobacterium aquaticum</i> (LC025990)	Semillas de arroz	99	<i>Methylobacterium aquaticum</i> (AJ635303)	100
MZ5MKN75	1	Bacteria no cultivada (HM921109)	Agua potable	99	<i>Hyphomicrobium facile</i> subsp. <i>ureaphilum</i> (Y14310)	96
MZ5MKN21	1	<i>Pedomicrobium</i> sp. no cultivado (JF460988)	Agua potable	99	<i>Pedomicrobium ferrugineum</i> (X97690)	99
MZ5MKN33	1	<i>Beijerinckiaceae</i> (LN614695)	Suelo criptobiótico	99	<i>Methylocapsa aurea</i> (FN433469)	97

Betaproteobacteria						
MZ5MNK51	6	Burkholderiales no cultivado (JQ254437)	Intestinos de hormiga	99	<i>Aquabacterium commune</i> (AF035054)	98
MZ5MNK36	1	<i>Burkholderia</i> sp. (JN872505)	Néctar floral	99	<i>Burkholderia caledonica</i> (BAYE01000050)	98
MZ5MNK35	1	Bacteria no cultivada (JF809212)	Rizosfera de patata	83	<i>Noviherbaspirillum suwonense</i> (JX275858)	83
MZ5MNK65	1	Bacteria no cultivada (KC872879)	Agua marina superficial	99	<i>Advenella kashmirensis</i> (AFQG01000022)	99
Actinobacteria						
MZ5MNK48	2	<i>Smaragdicoccus niigatensis</i> (NR_041353)	Muestras de suelo	99	<i>Smaragdicoccus niigatensis</i> (AQXZ01000013)	99
MZ5MNK86	1	<i>Streptomyces</i> sp. (LN881681)	Cueva de Altamira	99	<i>Streptomyces spiroverticillatus</i> (AB249921)	99
MZ5MNK68	1	Bacteria no cultivada (KF097559)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	84	<i>Propionibacterium acnes</i> (AWZZ01000008)	84
MZ5MNK73	1	Bacteria no cultivada (HM342910)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	99	<i>Propionibacterium acnes</i> (AWZZ01000008)	100
Firmicutes						
MZ5MNK25	1	Bacteria no cultivada (JF122918)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	99	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (L37605)	99
MZ5MNK31	1	Bacteria no cultivada (HM306103)	Piel, <i>Homo sapiens</i>	98	<i>Clostridium lactatifermentans</i> (AY033434)	94
Armatimonadetes						
MZ5MNK23	1	Bacteria no cultivada (HM065762)	Glaciar	98	<i>Fimbriimonas ginsengisoli</i> (GQ339893)	90
Gemmatimonadetes						
MZ5MNK39	1	Bacteria no cultivada (HM187367)	Sedimento subterráneo	97	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	84
Bacterias sin clasificar*						
MZ5MNK64	1	<i>Pedomicrobium</i> sp. no cultivado (JF460988)	Agua potable	79	-	-

*No fue posible clasificar los OTUs con un porcentaje de similitud menor del 80% (EZtaxon), por lo que no se especifica la especie cultivada más cercana.

En el análisis matemático de la distribución de las secuencias de los clones se obtuvieron curvas de rarefacción para estimar la biodiversidad en las muestras naturales de mucolitos. Las generadas a nivel de especie, 97% de similitud, y de género, 95% de similitud, no alcanzaron la fase de saturación en ninguna de las dos muestras MZ04-4 y MZ04-5, aunque sí lo hicieron las generadas a nivel de filo, 80% de similitud (Figura 5.14 A y B). Este hecho sugirió que un mayor número de secuenciaciones podría detectar filotipos bacterianos adicionales. Sin embargo, teniendo en cuenta las complicaciones surgidas en las amplificaciones por PCR y las clonaciones de estas muestras, no resultó de interés repetir el proceso en más ocasiones, por lo que se llevó a cabo el análisis de los clones obtenidos para caracterizar los principales microorganismos presentes en los mucolitos de la Cueva del Llano de los Caños.

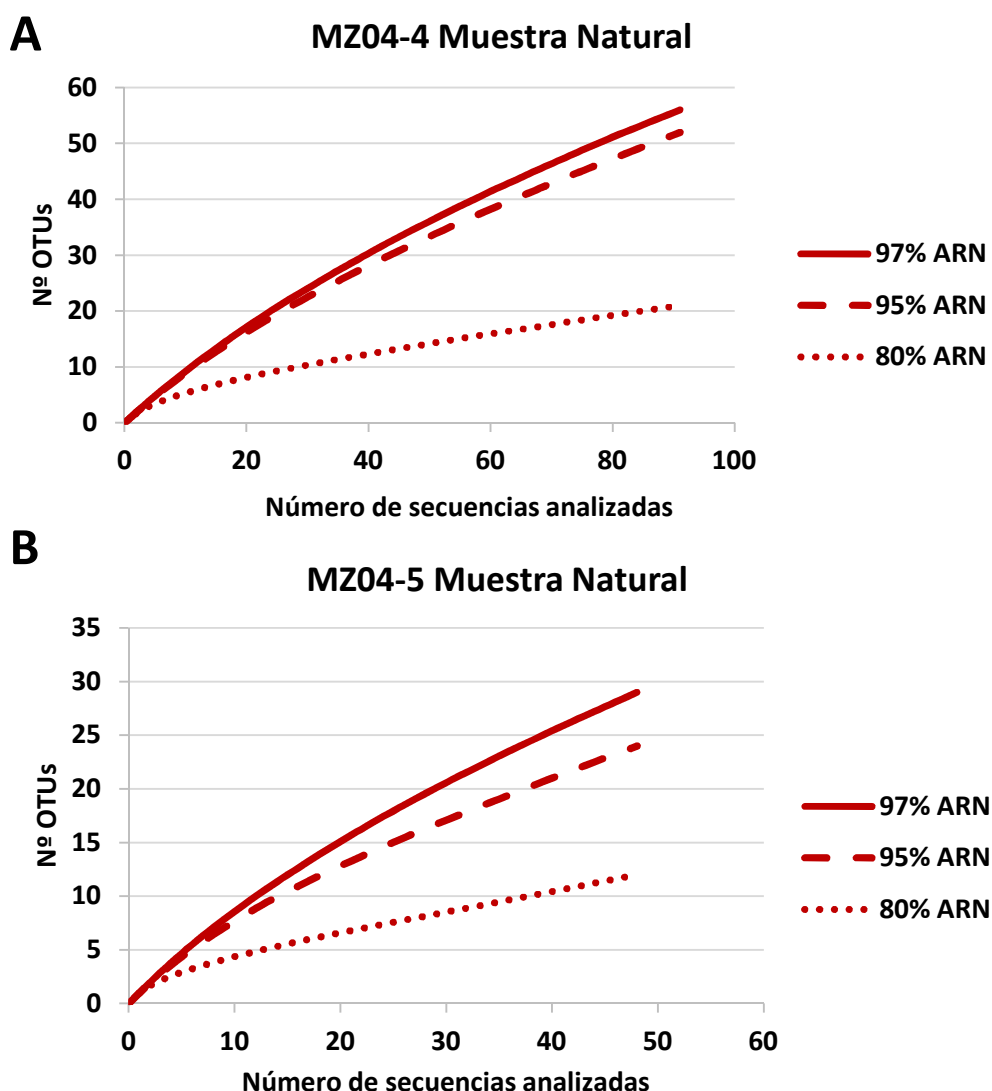


Figura 5.14 Curvas de rarefacción de las muestras de mucolitos de la Cueva del Llano de los caños. A. Muestra MZ04-4. B. Muestra MZ04-5. Se representa el número de secuencias analizadas frente al número de OTUs generados a tres niveles de similitud: especie (97%), género (95%) y filo (80%). Genoteca de ARN (—).

➤ **Caracterización morfológica**

Las observaciones mediante microscopio electrónico de barrido permitieron constatar la naturaleza orgánica característica de los mucolitos de la Cueva del Llano de los Caños.

Las muestras frescas, previamente cubiertas con una película de oro y paladio, se observaron al FESEM. Se detectó un biofilm con abundantes hebras colapsadas (Figura 5.15), debido a que la muestra no fue previamente fijada. Asociada a esta matriz viscosa, no se observaron abundantes células bacterianas, a excepción de estructuras filamentosas (Figura 5.15 A), como por ejemplo filamentos reticulados (Figura 5.15 B y D).

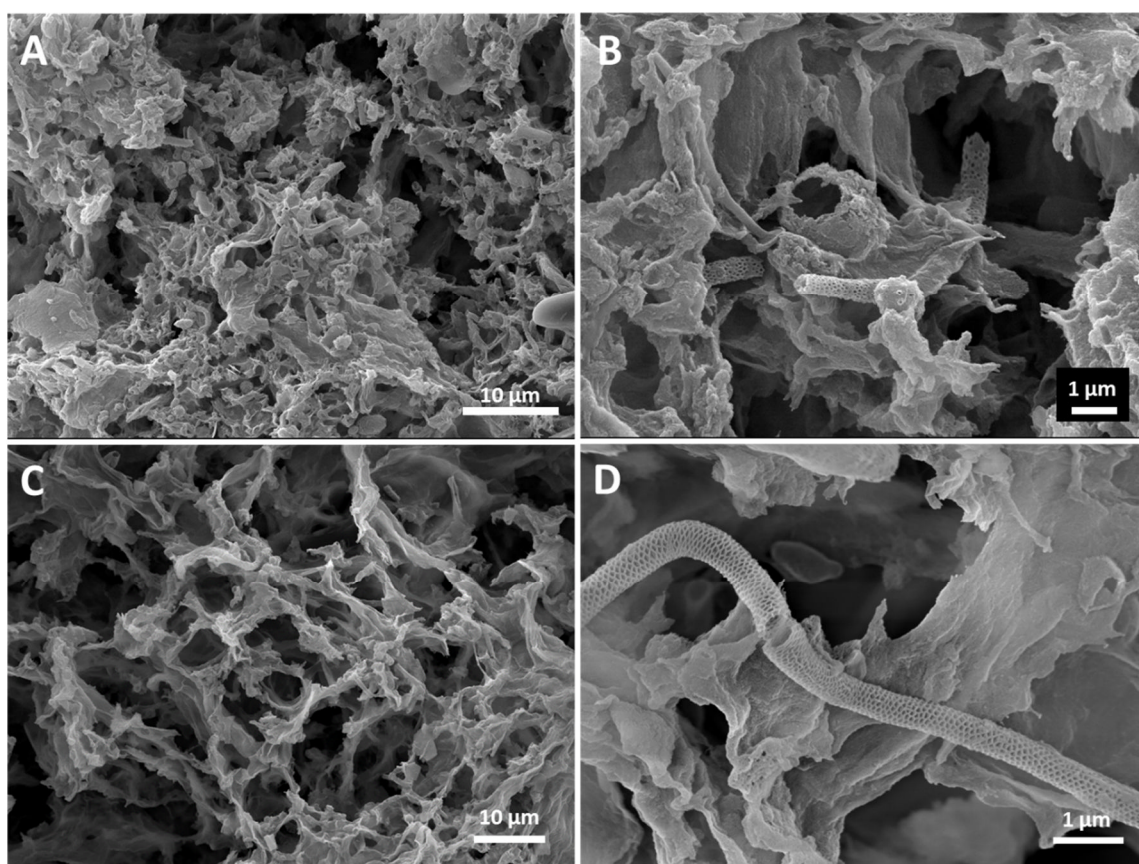


Figura 5.15 Imágenes tomadas mediante FESEM de las muestras de mucolitos de la Cueva del Llano de los Caños. A. Aspecto de la muestra MZ04-4. Las células observadas son escasas y no poseen mineralización. B. Filamento reticulado entre las estructuras deshidratadas de la muestra MZ04-4. C. Aspecto de la muestra MZ04-5, con depósitos orgánicos deshidratados formando una red de hebras colapsadas y entrelazadas. D. Filamento reticulado de la muestra MZ04-5.

En cuanto a la composición elemental de las muestras de mucolitos MZ04-4 y MZ04-5, analizada mediante EDS, consistió mayoritariamente en aluminio y silicio, además de carbono, calcio y hierro.

5.3.3 MUESTRA DE DEPÓSITOS NEGROS MNGC-1 (GRAN CANARIA)

➤ Bacterias cultivadas

Al igual que con las muestras anteriores del tubo de lava de la Cueva del Llano de los Caños, los depósitos negros MNGC-1 del tubo de lava de la Mina de los Cernícalos de la isla de Gran Canaria no mostraron prácticamente ningún crecimiento en los medios de cultivo que se emplearon, pudiéndose aislar únicamente 8 cepas bacterianas, agrupadas en 5 especies diferentes.

La Tabla 5.9 recoge las identificaciones de los aislamientos, mostrándose las especies filogenéticamente más próximas disponibles en la base de datos Ez-Taxon.

Las afiliaciones filogenéticas de dichas cepas bacterianas se distribuyeron en el filo Firmicutes y la clase Gammaproteobacteria. Firmicutes fue el filo más abundante, abarcando a 7 de las 8 secuencias obtenidas. *Bacillus* fue el género más aislado, con seis de los aislamientos afiliados a él. Además, una secuencia perteneció a la especie *Paenibacillus lupini*.

La clase Gammaproteobacteria estuvo representada por una única cepa correspondiente a la especie *Lysobacter panacisoli*.

Respecto a su fuente de aislamiento, las cepas bacterianas más cercanas taxonómicamente a las aisladas de los depósitos negros de la Mina de los Cernícalos provinieron de suelos, muestras ambientales y de nódulos del altramuz blanco.

Tabla 5.9 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas aisladas de la muestra MNGC-1.

Cepa	Nº de aislados*	Identificación molecular Ez Taxon (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)
Firmicutes				
MNGC1-ROUF2	4	<i>Bacillus acidiceler</i> CBD 119 (DQ374637)	Muestra ambiental	99
MNGC1-ROUF1	1	<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048 (ACMU01000002)	Suelo	97
MNGC3-ROUF1	1	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 (AB363738)	Suelo árido	100
MNGC3-ROUF2	1	<i>Paenibacillus lupini</i> RLAHU15 (KF769449)	Nódulos de <i>Lupinus albus</i>	100
Gammaproteobacteria				
MNGC1-ROUF3	1	<i>Lysobacter panacisoli</i> CJ29 (JQ806748)	Suelo bajo ginseng	99

* Aislamientos que comparten una similitud $\geq 99\%$.

➤ **Cultivos de enriquecimiento**

Los cultivos de enriquecimiento de la muestra de depósitos negros de ferromanganeso MNGC-1 en medios líquidos selectivos mostraron crecimiento visible tras un periodo de incubación de aproximadamente un mes. El crecimiento en el medio Rouf modificado estuvo asociado con abundantes precipitados de color marrón intenso (Figura 5.16).



Figura 5.16 Matraz con la muestra MNGC-1 de depósitos negros de la Mina de los Cernícalos sembrada en medio de cultivo Rouf modificado, mostrando precipitados de color marrón oscuro.

Del cultivo de enriquecimiento en medio Rouf modificado de la muestra MNGC-1 se construyó una genoteca de ADN, para realizar un análisis de los microorganismos totales presentes en el mismo, teniendo en cuenta los resultados del análisis por DGGE, descrito en el apartado 5.3.4. Esta genoteca de ADN fue elaborada con un total de 44 secuencias libres de quimeras.

La distribución de los diferentes filos en la muestra se presenta en la Figura 5.17 y las identificaciones de las secuencias obtenidas en la Tabla 5.10, clasificadas en 13 OTUs.

El filo Firmicutes fue el más abundante, abarcando el 66% del total de secuencias obtenidas, estando representado en su totalidad por la especie *Bacillus thuringiensis*.

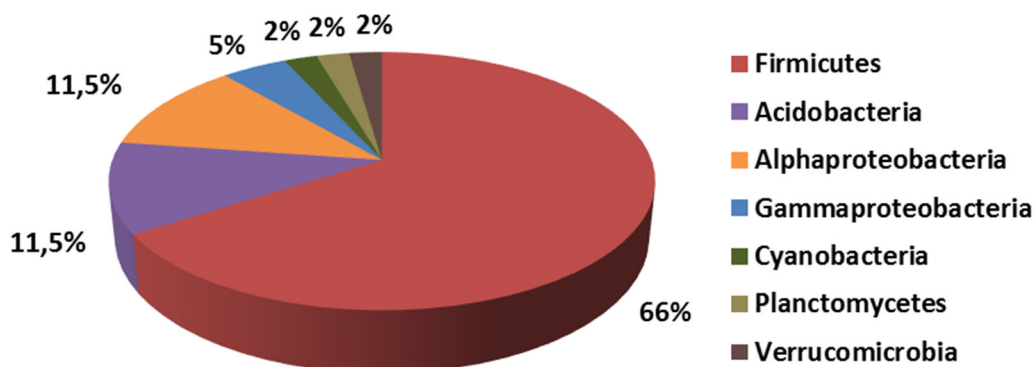


Figura 5.17 Distribución de las secuencias de la genoteca de ADN correspondiente al cultivo de enriquecimiento en medio Rouf modificado de los depósitos negros MNGC-1 de la Mina de los Cernícalos.

Los grupos taxonómicos que comprendieron más secuencias tras Firmicutes correspondieron al filo Acidobacteria y la clase Alphaproteobacteria, ambos con un 11,5% del total, sin embargo sólo *Ensifer adhaerens* en Alphaproteobacteria alcanzó una similitud suficiente para su identificación.

La clase Gammaproteobacteria (5%), abarcó dos secuencias en total, ambas afiliadas a la especie *Acinetobacter schindleri*.

Los tres filos minoritarios de Cyanobacteria, Planctomycetes y Verrucomicrobia representaron un 6% en total, sin posible identificación de especie o género.

También se analizaron las procedencias de las identificaciones de las secuencias obtenidas de la muestra del cultivo de enriquecimiento, según los datos del NCBI (Tabla 5.10). El 70,5% de los clones secuenciados mostraron similitudes con bacterias procedentes de raíces y el suelo asociado a ellas. Un 15,9% correspondió a bacterias de otro tipo de suelos y sedimentos. Otras fuentes de aislamiento con menor representación fueron agua marina (4,5%), limolita (4,5%), la Cueva Lechuguilla en EE.UU. (2,3%) y un caracol de agua dulce (2,3%).

Tabla 5.10 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias totales obtenidas del cultivo de enriquecimiento en medio Rouf modificado de la muestra MNGC-1 (44 secuencias, 13 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Firmicutes						
MG1CEC11	28	<i>Bacillus thuringiensis</i> (KJ767341)	Rizosfera	99	<i>Bacillus thuringiensis</i> (ACNF01000156)	100
MG1CEG7	1	<i>Bacillus thuringiensis</i> (FR877760)	Suelo asociado a raíces	91	<i>Bacillus thuringiensis</i> (ACNF01000156)	96
Acidobacteria						
MG1CEG10	2	Bacteria no cultivada (GQ396963)	Suelo	99	<i>Aridibacter famidurans</i> (KJ767341)	94
MG1CEE11	2	Proteobacteria no cultivada (EF663566)	Pradera	97	<i>Pyrinomonas methylaliphatogetes</i> (AM749787)	84
MG1CEG11	1	Bacteria no cultivada (AB660746)	Suelo de arrozal	93	<i>Aridibacter famidurans</i> (KJ767341)	91
Alphaproteobacteria						
MG1CED12	2	Bacteria no cultivada (EU801583)	Agua marina	99	Candidatus <i>Sphaeronema italicum</i> (AY428765)	90
MG1CEF8	1	<i>Ensifer</i> sp. (JQ014496)	Cueva Lechuguilla	99	<i>Ensifer adhaerens</i> (AM181733)	99
MG1CEC7	1	Bacteria no cultivada (FJ228809)	Caracol de agua dulce	96	<i>Rhodoplanes elegans</i> (D25311)	92
MG1CEG8	1	Bacteria no cultivada (EU869795)	Sedimento	99	<i>Sphingomonas indica</i> (HQ449390)	97
Gammaproteobacteria						
MG1CEE7	2	<i>Acinetobacter schindleri</i> (KC934833)	Limolita	99	<i>Acinetobacter schindleri</i> (APPQ01000011)	99
Verrucomicrobia						
MG1CED11	1	Verrucomicrobia (AY960780)	Suelo	96	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> (ABIZ01000001)	83
Cyanobacteria						
MG1CEG9	1	Bacteria no cultivada (JN698065)	Raíz de arroz	99	<i>Gloeobacter violaceus</i> (BA000045)	81
Planctomycetes						
MG1CED9	1	Planctomycetes no cultivado (JQ861342)	Suelo de la rizosfera del cacahuete	99	Candidatus <i>Kuenenia stuttgartiensis</i> (CT573071)	80

En el análisis matemático de la distribución de las secuencias de los clones, las curvas de rarefacción obtenidas a nivel de especie, 97% de similitud, y de género, 95% de similitud, se mantuvieron en la fase exponencial, aunque con una pendiente suavizada. Únicamente la curva obtenida a nivel de filo, 80% de similitud, se aproximó a la saturación (Figura 5.18).

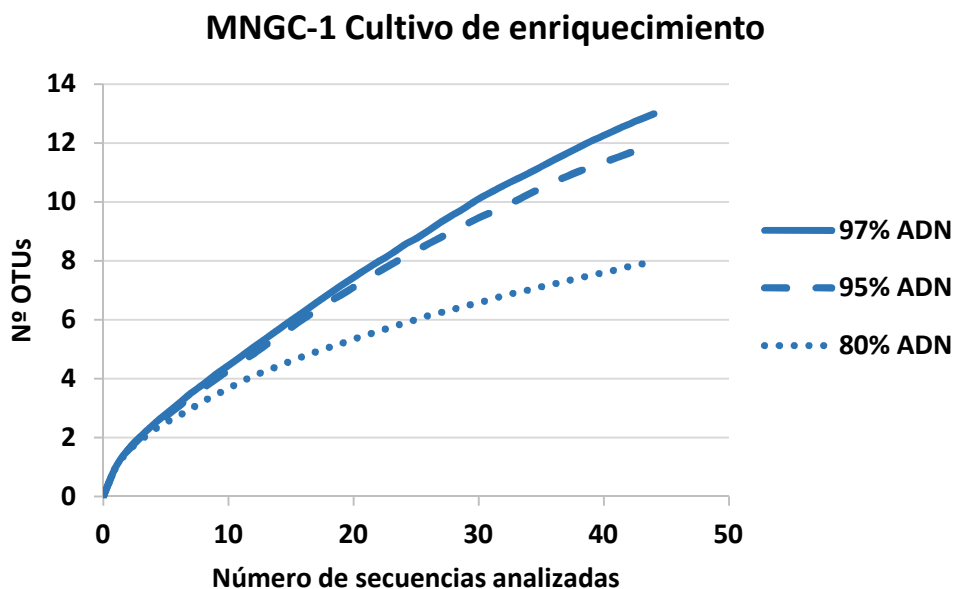


Figura 5.18 Curvas de rarefacción del cultivo de enriquecimiento de la muestra MNGC-1. Se representa el número de secuencias analizadas frente al número de OTUs generados a tres niveles de similitud: especie (97%), género (95%) y filo (80%). Genoteca de ADN (—).

➤ **Estudio de las comunidades bacterianas de la muestra natural MNGC-1 mediante la construcción de una genoteca de ADN**

El análisis de la muestra natural de la Mina de los Cernícalos MNGC-1 tampoco estuvo exento de problemas. Tras la extracción de los ácidos nucleicos de los depósitos negros de ferromanganeso, la amplificación por PCR volvió a resultar negativa para el ADNc, por lo que únicamente se pudo proceder con el estudio de la comunidad total de bacterias. La genoteca de ADN fue elaborada con 110 secuencias libres de quimeras.

La distribución de los diferentes filos microbianos en esta muestra puede observarse en la Figura 5.19.

Los dos filos que incluyeron a la mayor parte de los clones bacterianos analizados fueron Proteobacteria (46%) y Actinobacteria (22%). Proteobacteria estuvo distribuido en cuatro clases, siendo Alphaproteobacteria mucho más abundante respecto a Beta-, Gamma- y Deltaproteobacteria, alcanzando un 35% del total frente al 11% logrado de forma combinada por las otras tres clases.

El resto de los filos presentes en estas muestras se detectaron con porcentajes menores al 10%: Planctomycetes (7%), Chloroflexi (7%), Acidobacteria (6%), Firmicutes (2%), Nitrospirae (2%), Armatimonadetes (1%), Gemmatimonadetes (1%) y Verrucomicrobia (1%).

Además, un 5% de los clones de esta muestra correspondió a bacterias con una similitud menor del 80% (Eztaxon), lo que no permitió su afiliación y clasificación.

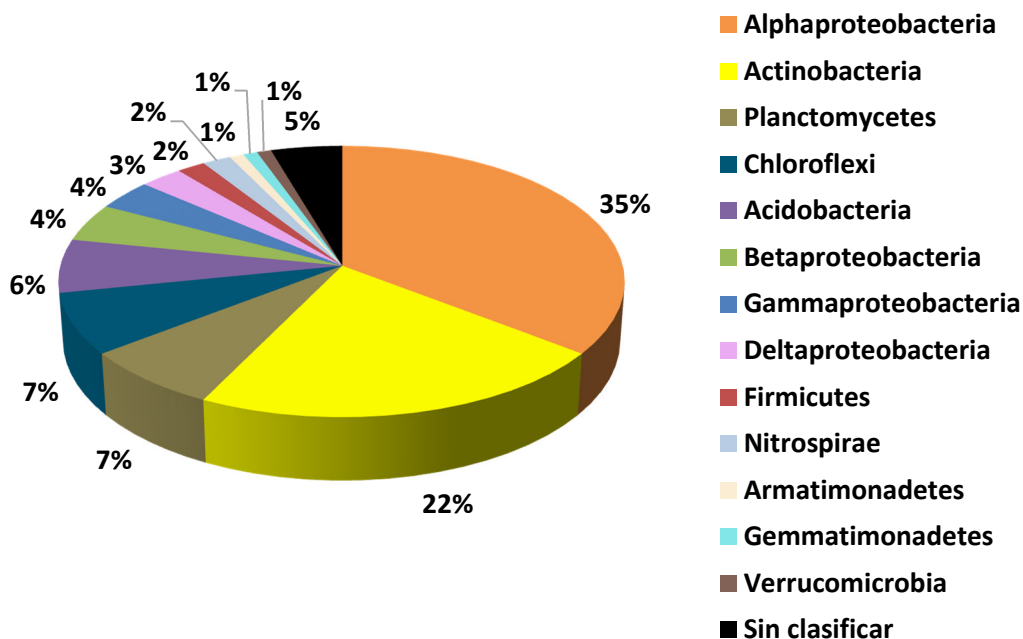


Figura 5.19 Distribución de filos en la muestra de depósitos negros de ferromanganeso de la Mina de los Cernícalos, correspondiente a la genoteca de ADN de MNGC-1.

Las identificaciones de las 110 secuencias obtenidas se muestran en la Tabla 5.11, clasificadas en 101 OTUs.

Dentro de la clase Alphaproteobacteria, los géneros más detectados fueron *Hyphomicrobium* (11,8% del total de secuencias), *Sphingomonas* (5,5%), *Pedomicrobium* (4,5%) y *Rhodoplanes* (2,7%).

Además, en el filo Nitrospirae se detectaron secuencias relacionadas con el género *Nitrospira*, con un 95% de similitud máxima.

El resto de los filos y clases mostraron secuencias con similitudes entre el 94 y 80% que impiden su adscripción a un género o especie.

Por último, las secuencias obtenidas de las muestras naturales de los depósitos negros de la Mina de los Cernícalos y sus identificaciones se analizaron según su procedencia, atendiendo a los datos del NCBI (Tabla 5.11).

Prácticamente la mitad de las bacterias más cercanas taxonómicamente a los clones obtenidos de los depósitos negros de la Mina de los Cernícalos, el 49,1%, procedieron de suelos y sedimentos, siendo las fuentes de aislamiento más frecuentes. Un 23,6% del total correspondió a bacterias procedentes de biofilms microbianos y depósitos orgánicos presentes en tubos de lava, estando muy bien representados por tanto en esta muestra.

El 5,5% correspondió a bacterias de raíces y el 4,5% a bacterias de cuevas, entre las que se encuentran la Cueva Colosal (EE.UU.), la Cueva Asperge (Francia), la Cueva de Lascaux (Francia) y la Cueva de Altamira (España).

El 17,3% restante correspondió procedencias bacterianas con menor representación, como otros biofilms, microbialitas, depósitos en el túnel de granito de Parahos (Portugal), nódulos polimetálicos, manantiales de agua dulce, etc.

Tabla 5.11 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias totales obtenidas de la muestra MNGC-1 (110 secuencias, 101 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Alphaproteobacteria						
MG1MNKG4	4	Bacteria no cultivada (EU869795)	Sedimento	98	<i>Sphingomonas indica</i> (HQ449390)	97
MG1MNKB2	3	Bacteria no cultivada (JN672135)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Hyphomicrobium vulgare</i> (Y14302)	98
MG1MNKC6	2	Bacteria no cultivada (JN671983)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Hyphomicrobium facile</i> subsp. <i>ureaphilum</i> (Y14310)	97
MG1MNKH1	1	Rhizobiales no cultivado (KJ410598)	Suelo bajo pino	98	<i>Pseudolabrys taiwanensis</i> (DQ062742)	94
MG1MNKG11	1	Bacteria no cultivada (JN606991)	Biofilm en tubo de lava	94	Candidatus <i>Sphaeronema italicum</i> (AY428765)	92
MG1MNKG8	1	Bacteria no cultivada (JN672203)	Biofilm en tubo de lava	93	<i>Hyphomicrobium vulgare</i> (Y14302)	92
MG1MNKG7	1	Bacteria no cultivada (JN616128)	Depósito orgánico de la pared de un tubo de lava	95	<i>Roseomonas mucosa</i> (AF538712)	81
MG1MNKG3	1	Bacteria no cultivada (AB672208)	Suelo de arrozal	98	<i>Methylovirgula ligni</i> (FM252034)	92
MG1MNKG1	1	Bacteria no cultivada (GQ500729)	Cueva Colosal	89	<i>Tepidamorphus gemmatus</i> (GU187912)	88
MG1MNKF11	1	Bacteria no cultivada (HM444929)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Pedomicrobium australicum</i> (X97693)	96
MG1MNKF8	1	Bacteria no cultivada (JF265722)	Biofilm en tubo de lava	94	<i>Dongia mobilis</i> (FJ455532)	90
MG1MNKE11-2	1	<i>Hyphomicrobiaceae</i> no cultivado (JF681848)	Suelo	94	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> (Y14304)	93
MG1MNKD10-2	1	Alphaproteobacteria no cultivada (CU925832)	Digestor anaeróbico	86	<i>Hyphomicrobium nitrativorans</i> (CP006912)	90
MG1MNKG11-2	1	Rhizobiales no cultivado (HQ462538)	Suelo de glaciar	95	<i>Rhodoplanes roseus</i> (D25313)	93
MG1MNKF12-2	1	Alphaproteobacteria no cultivada (CU925832)	Digestor anaeróbico	98	<i>Hyphomicrobium nitrativorans</i> (CP006912)	91
MG1MNKH11-2	1	Alphaproteobacteria no cultivada (HG325767)	Depósito rojo en túnel de granito de Paranhos	97	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> (Y14304)	94
MG1MNKE10-2	1	Bacteria no cultivada (JN616202)	Biofilm en tubo de lava	96	<i>Rhodoplanes elegans</i> (D25311)	95
MG1MNKE9-2	1	Bacteria no cultivada (HM445358)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Pedomicrobium manganicum</i> (X97691)	96
MG1MNKE12-2	1	Bacteria no cultivada (EU132062)	Suelo de pradera	94	<i>Pedomicrobium manganicum</i> (X97691)	89
MG1MNKB12-2	1	Bacteria no cultivada (JN615742)	Biofilm en tubo de lava	92	<i>Azospirillum fermentarium</i> (JX843282)	87

MG1MNKB10-2	1	Alphaproteobacteria no cultivada (KF827150)	Biofilm	97	<i>Bauldia consociata</i> (FJ560750)	94
MG1MNNKC1	1	Bacteria no cultivada (AB696457)	Suelo	92	<i>Sphingomonas endophytica</i> (HM629444)	91
MG1MNNKD1	1	Bacteria no cultivada (JN615664)	Biofilm en tubo de lava	96	<i>Pedomicrobium manganicum</i> (X97691)	98
MG1MNNKC9	1	Bacteria no cultivada (JF417780)	Carbón	94	<i>Sphingomonas indica</i> (HQ449390)	96
MG1MNNKC3	1	Bacteria no cultivada (AY957911)	Aguas residuales	99	<i>Hyphomicrobium aestuarii</i> (Y14304)	99
MG1MNNKD2	1	Bacteria no cultivada (HM186645)	Sedimento subterráneo	97	<i>Candidatus Sphaeronema italicum</i> (AY428765)	91
MG1MNNKB6	1	Bacteria no cultivada (HQ143895)	Microbialita	91	<i>Filomicrobium fusiforme</i> (Y14313)	87
MG1MNNKB3	1	Bacteria no cultivada (HM444863)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Filomicrobium insigne</i> (EF117253)	90
MG1MNNKF7	1	Bacteria no cultivada (HE861245)	Suelo de rizosfera	99	<i>Rhodoplanes roseus</i> (D25313)	93
MG1MNNKE8	1	Bacteria no cultivada (HM749696)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Methylosinus sporium</i> (Y18946)	93
MG1MNNKE7	1	Bacteria no cultivada (JX226903)	Nódulo polimetálico	94	<i>Hyphomicrobium sulfonivorans</i> (AF235089)	90
MG1MNNKD11	1	Alphaproteobacteria no cultivada (CU925832)	Digestor anaeróbico	98	<i>Hyphomicrobium nitrativorans</i> (CP006912)	93
MG1MNNKD9	1	Bacteria no cultivada (HM445358)	Biofilm en tubo de lava	89	<i>Pedomicrobium australicum</i> (X97693)	90
Actinobacteria						
MG1MNNKB9-2	3	Bacteria no cultivada (EF018968)	Rizosfera	98	<i>Ilumatobacter fluminis</i> (AB360343)	91
MG1MNNKC10	1	Bacteria no cultivada (HE861102)	Rizosfera	99	<i>Ilumatobacter fluminis</i> (AB360343)	91
MG1MNNKE4	1	Actinobacteria no cultivada (JN868128)	Sedimento de un lago	97	<i>Ilumatobacter fluminis</i> (AB360343)	89
MG1MNNKF5	1	Bacteria no cultivada (KC189789)	Manantial de agua dulce	94	<i>Ilumatobacter fluminis</i> (AB360343)	88
MG1MNNKB4	1	Bacteria no cultivada (KC189789)	Manantial de agua dulce	93	<i>Ilumatobacter fluminis</i> (AB360343)	87
MG1MNNKE11	1	Bacteria no cultivada (DQ129258)	Aerosol urbano	96	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	94
MG1MNNKD6	1	Bacteria no cultivada (FJ478592)	Suelo de pradera	99	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	94
MG1MNNKE6	1	Actinobacteria no cultivada (JN037881)	Suelo salino alcalino	96	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	94
MG1MNNKG6	1	Bacteria no cultivada (JN616142)	Depósito orgánico de la pared de un tubo de lava	98	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	93
MG1MNNKH8	1	Bacteria no cultivada (EU132848)	Suelo de pradera	97	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	93
MG1MNNKD4	1	Rubrobacterales no cultivado (EU193089)	Suelo agrícola	95	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	93

Capítulo 5

MG1MNKA2	1	Bacteria no cultivada (KC554679)	Suelo de montaña	96	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	92
MG1MNKB11	1	Bacteria no cultivada (AM910048)	Rizosfera de arrozal	96	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	91
MG1MNKD5	1	Actinobacteria no cultivada (JN037881)	Suelo salino alcalino	95	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	90
MG1MNKG9-2	1	Actinobacteria no cultivada (JN037881)	Suelo salino alcalino	92	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	89
MG1MNKC7	1	Bacteria no cultivada (EU132968)	Suelo de pradera	92	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	88
MG1MNKG5	1	Bacteria no cultivada (AB696353)	Suelo	88	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	83
MG1MNKH3	1	Bacteria no cultivada (HM445518)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	94
MG1MNKB11-2	1	Bacteria no cultivada (FJ592843)	Suelo húmedo volcánico	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	92
MG1MNKF12	1	Rubrobacteridae no cultivado (AM935691)	Suelo contaminado	91	<i>Solirubrobacter ginsenosidimutans</i> (EU332825)	91
MG1MNKF10-2	1	Bacteria no cultivada (KC554974)	Suelo de montaña	85	<i>Solirubrobacter ginsenosidimutans</i> (EU332825)	81
MG1MNKB5	1	Bacteria no cultivada (JF265944)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Streptomyces aomiensis</i> (AB522686)	88
Chloroflexi						
MG1MNKC11	2	Bacteria no cultivada (JN801077)	Biofilm en tubo de lava	95	<i>Litorilinea aerophila</i> (JQ733906)	89
MG1MNKF1	1	Chloroflexi no cultivado (JN409095)	Suelo de rizosfera	97	<i>Dehalogenimonas alkenigignens</i> (JQ994266)	83
MG1MNKH5	1	Chloroflexi no cultivado (KJ750921)	Cueva Asperge	94	<i>Dehalogenimonas alkenigignens</i> (JQ994266)	82
MG1MNKG9	1	Bacteria no cultivada (JN607039)	Biofilm en tubo de lava	91	<i>Ardenticatena maritima</i> (AB576167)	80
MG1MNKB10	1	Bacteria no cultivada (EU134137)	Suelo de pradera	92	<i>Litorilinea aerophila</i> (JQ733906)	81
MG1MNKA11-2	1	Bacteria no cultivada (JX079436)	Suelo contaminado	98	<i>Dehalococcoides mccartyi</i> (CP000027)	83
MG1MNKE12	1	Bacteria no cultivada (EU134137)	Suelo de pradera	94	<i>Levilina saccharolytica</i> (AB109439)	83
Planctomycetes						
MG1MNKH10	1	Bacteria no cultivada (EU135251)	Suelo de pradera	93	<i>Gemmata obscuriglobus</i> (ABGO01000325)	85
MG1MNKE2	1	Bacteria no cultivada (FJ232680)	Aguas residuales	94	<i>Gemmata obscuriglobus</i> (ABGO01000325)	85
MG1MNKG12	1	Bacteria no cultivada (EU135205)	Suelo de pradera	98	<i>Gemmata obscuriglobus</i> (ABGO01000325)	84
MG1MNKD7	1	Bacteria no cultivada (KC551552)	Lodo activado	93	<i>Gemmata obscuriglobus</i> (ABGO01000325)	81
MG1MNKG10	1	Bacteria no cultivada (HM187128)	Sedimento subterráneo	89	<i>Candidatus Brocadia anammoxidans</i> (AF375994)	80
MG1MNKD12	1	Planctomycete no cultivado (AB294970)	Biofilm microbiano	92	<i>Planctomyces maris</i> (ABCE01000043)	90

Tubos de lava de La Palma y Gran Canaria (Islas Canarias, España)

MG1MNKD12-2	1	Bacteria no cultivada (HQ143884)	Microbialita	97	<i>Zavarzinella Formosa</i> (AM162406)	84
MG1MNKD11-2	1	Bacteria no cultivada (KJ407420)	Suelo forestal	90	<i>Blastopirellula marina</i> (AANZ01000021)	85
Acidobacteria						
MG1MNKC10-2	1	Acidobacteria no cultivada (HQ597886)	Suelo de pradera	97	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	85
MG1MNBH12	1	Acidobacteria no cultivada (HM062008)	Suelo	98	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	84
MG1MNBK9	1	Bacteria no cultivada (GQ500700)	Sedimentos arenosos	93	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	83
MG1MNBH9	1	Bacteria no cultivada (JQ978901)	Cueva de Altamira	99	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634)	91
MG1MNBK7	1	Bacteria no cultivada (AY703473)	Cueva de Altamira	96	<i>Aridibacter famidurans</i> (KF245634)	89
MG1MNBK3	1	Bacteria no cultivada (HM445170)	Biofilm microbiano	97	<i>Telmatobacter bradus</i> (AM887760)	84
MG1MNBK8	1	Acidobacteria no cultivada (HQ729794)	Suelo de pradera	95	<i>Granulicella cerasi</i> (AB548308)	80
Betaproteobacteria						
MG1MNBK8	1	Burkholderiales no cultivado (EU449565)	Suelo agrícola	97	<i>Cupriavidus gilardii</i> (EU024163)	90
MG1MNBK9	1	Bacteria no cultivada (AB672107)	Suelo de arrozal	93	<i>Cupriavidus gilardii</i> (EU024163)	90
MG1MNBH4	1	Betaproteobacteria no cultivada (EF663334)	Tierras de cultivo	92	<i>Cupriavidus gilardii</i> (EU024163)	87
MG1MNBK3	1	Bacteria no cultivada (JF265966)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Sterolibacterium denitrificans</i> (AJ306683)	91
MG1MNBK3	1	Bacteria no cultivada (FJ810580)	Agua contaminada	98	<i>Burkholderia dabaoshanensis</i> (FJ210816)	92
Gammaproteobacteria						
MG1MNBK2	1	Bacteria no cultivada (EU134727)	Suelo de pradera	94	<i>Coxiella burnetii</i> (CP000890)	90
MG1MNBK12	1	Bacteria no cultivada (AB930520)	Agua de un embalse	96	<i>Thiomargarita namibiensis</i> (FR690879)	90
MG1MNBK7	1	Bacteria no cultivada (EU790333)	Cueva de Lascaux	85	<i>Natronocella acetinitrilica</i> (EF103128)	83
MG1MNBK10	1	Bacteria no cultivada (JN592705)	Biofilm en tubo de lava	89	<i>Legionella impletisoli</i> (AB233209)	88
Deltaproteobacteria						
MG1MNBK8	1	Deltaproteobacteria no cultivada (AJ518795)	Muestra de suelo junto a residuos mineros	95	<i>Polyangium fumosum</i> (GU207879)	83
MG1MNBK10-2	1	Bacteria no cultivada (JQ366308)	Muestra de suelo	94	<i>Geobacter uraniireducens</i> (CP000698)	81
MG1MNBK1	1	Bacteria no cultivada (EF516387)	Suelo de pradera	92	<i>Phaselicystis flava</i> (EU545827)	86

Capítulo 5

Firmicutes						
MG1MNKC2	1	Bacteria no cultivada (HQ114069)	Suelo forestal	92	<i>Heliobacillus mobilis</i> (AB100835)	81
MG1MNKF2	1	Bacteria no cultivada (GQ397072)	Suelo	97	<i>Lutispora thermophila</i> (AB186360)	82
Nitrospirae						
MG1MNKA10-2	1	Nitrospirae no cultivado (HF584515)	Pinturas murales etruscas	92	<i>Nitrospira moscoviensis</i> (X82558)	92
MG1MNKF9	1	Bacteria no cultivada (JN801132)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Nitrospira moscoviensis</i> (X82558)	95
Gemmatimonadetes						
MG1MNKA12-2	1	Gemmatimonadetes no cultivado (EU979054)	Suelo	95	<i>Gemmatirosa kalamazoonesis</i> (CP007128)	83
Armatimonadetes						
MG1MNKC9-2	1	Bacteria no cultivada (EU135000)	Suelo de pradera	97	<i>Armatimonas rosea</i> (AB529679)	82
Verrucomicrobia						
MG1MNKA5	1	<i>Opitutus</i> sp. no cultivado (JF703563)	Suelo de rizosfera y raíz	91	<i>Opitutus terrae</i> (CP001032)	88
Bacterias sin clasificar*						
MG1MNKH7	1	Bacteria no cultivada (JX967657)	Suelo	96	-	-
MG1MNKH10	1	Bacteria no cultivada (AB658908)	Suelo de arrozal	91	-	-
MG1MNKH9-2	1	Chloroflexi no cultivado (AM935498)	Suelo contaminado	86	-	-
MG1MNKF11-2	1	Bacteria no cultivada (JX079436)	Suelo contaminado	92	-	-
MG1MNKC12	1	Bacteria no cultivada (JQ817711)	Sedimentos marinos	86	-	-

*No fue posible clasificar los OTUs con un porcentaje de similitud menor del 80% (EZtaxon), por lo que no se especifica la especie cultivada más cercana.

El análisis matemático de la distribución de las secuencias de los clones mostró que las curvas de rarefacción obtenidas a nivel de especie, 97% de similitud, y de género, 95% de similitud, no alcanzaron la asíntota, de manera que únicamente la obtenida a nivel de filo, 80% de similitud, logró estabilizarse (Figura 5.20).

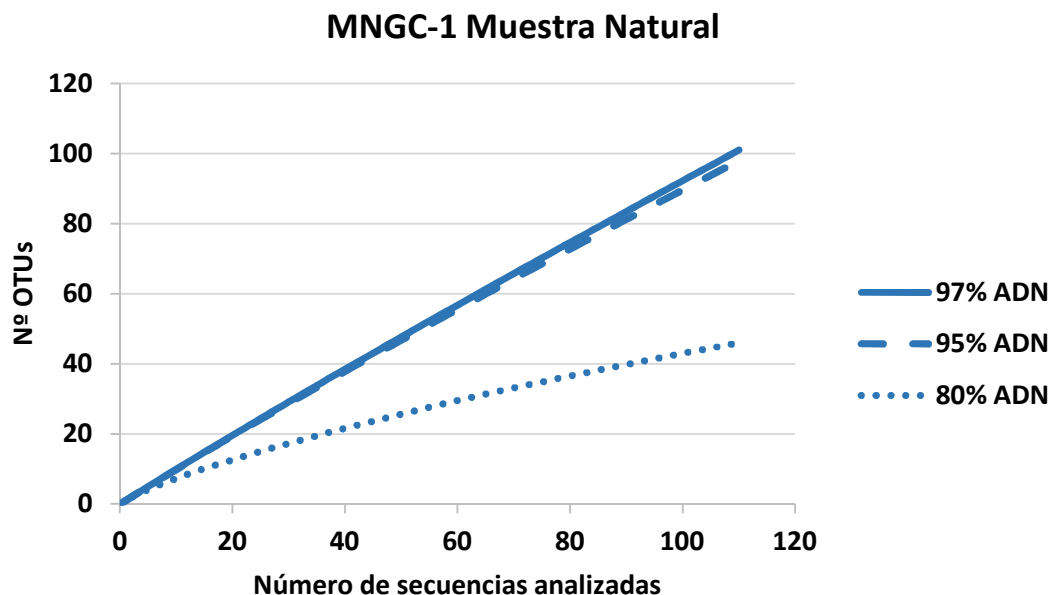


Figura 5.20 Curvas de rarefacción de la muestra natural MNGC-1. Se representa el número de secuencias analizadas frente al número de OTUs generados a tres niveles de similitud: especie (97%), género (95%) y filo (80%). Genoteca de ADN (—).

Estos resultados demostraron que los depósitos negros de ferromanganeso de la Mina de los Cernícalos poseían gran diversidad de comunidades bacterianas a nivel de especie y de género, como se puede comprobar por el hecho de que las curvas a estos niveles se encuentran en fase exponencial y prácticamente superpuestas entre sí.

Por otra parte, la amplificación de la muestra MNGC-1 con cebadores específicos de arqueas y hongos aportó resultados negativos.

➤ **Caracterización morfológica**

Las observaciones mediante FESEM de la muestra MNGC-1 pusieron de manifiesto la estructura característica de los óxidos de manganeso biogénicos, en forma de agregados porosos nodulares y reticulados (Figura 5.21 A), tratándose de los elementos más abundantes en ella, además de los óxidos de hierro.

También fue posible la detección de los enigmáticos filamentos reticulados, asociados con dichos depósitos minerales (Figura 5.21 B, C y D). En esta ocasión, la estructura reticulada resultó bastante evidente, encontrándose asociada a los óxidos de manganeso (Figura 5.21 C y D).

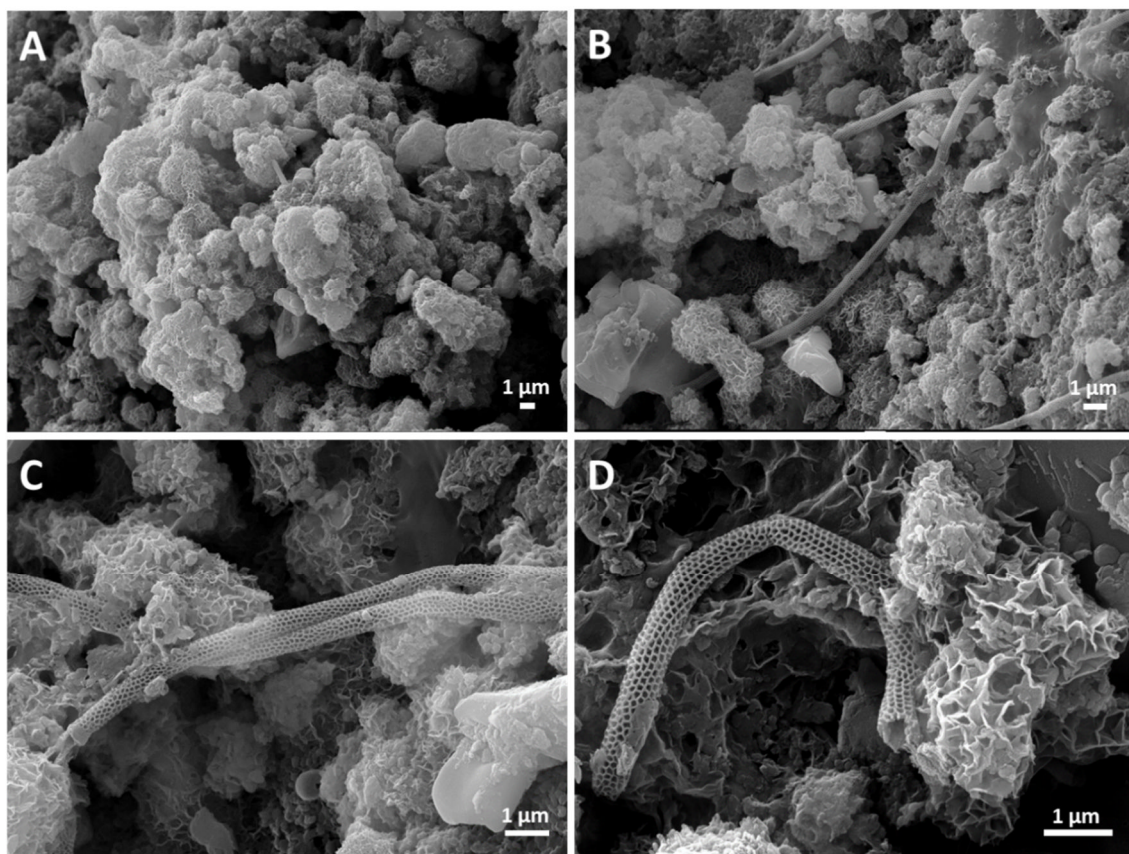


Figura 5.21 Imágenes FESEM de la muestra MNGC-1. A. Agregados minerales ricos en óxidos de manganeso, mostrando su estructura característica, asociados a células mineralizadas. B. C. y D. Filamentos reticulados asociados a los depósitos minerales de óxidos de manganeso.

➤ Estudio del gen *mofA*

En la muestra natural de ferromanganeso MNGC-1 de la Mina de los Cernícalos se llevó a cabo también el estudio del gen *mofA*, que interviene en la oxidación del Mn(II). Las parejas de cebadores MAU/MAL no permitieron obtener bandas a 700 pb. Sin embargo, con los cebadores degenerados MDF/MDR sí fue posible detectar una banda leve en la región de 250-200 pb con una segunda PCR (Figura 5.22).

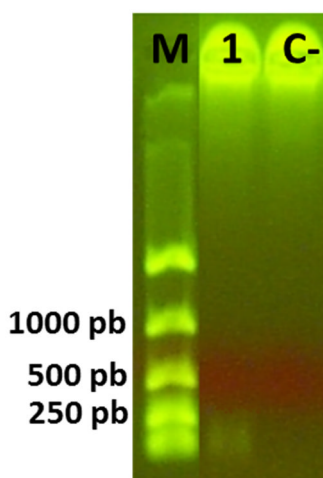


Figura 5.22 Banda positiva MNGC-1 obtenida en la PCR con los cebadores degenerados MDF/MDR. M: Marcador Easy Ladder I. 1: Muestra natural MNGC-1. C-: Control negativo.

5.3.4 ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS MEDIANTE DGGE

Se realizó un análisis comparativo de las comunidades microbianas de las muestras naturales MZ04-1, MZ04-4, MZ04-5 y MNGC-1 y sus respectivos cultivos de enriquecimiento mediante electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE), para evaluar la correspondencia con los resultados obtenidos en las genotecas elaboradas de esas mismas muestras.

Es preciso tener en cuenta la limitación de que, como ya se ha señalado anteriormente, no fue posible obtener ARN de MZ04-1 y MNGC-1, al igual que tampoco se consiguió amplificar mediante PCR el ADN de ambos mucolitos, por lo que la comunidad bacteriana total y la metabólicamente activa no se pudieron analizar en todas las muestras naturales objeto de estudio.

En la Figura 5.23 se muestran los patrones de bandas obtenidos en este análisis, de manera que es posible observar tanto diferencias como semejanzas entre las diferentes comunidades bacterianas.

Los patrones de bandas 1, 4, 7, 8 de la Figura 5.23 corresponden a las muestras naturales de los tubos de lava de Canarias. En los patrones de MZ04-1 (perfil 1) y MNGC-1 (perfil 4) se detectaron muy pocas bandas.

En los patrones de los mucolitos MZ04-4 (perfil 7) y MZ04-5 (perfil 8) no se observaron grandes diferencias, por lo que se pudo deducir que la distribución de las comunidades bacterianas de ambas muestras era muy parecida. Este hecho se pudo constatar en las respectivas genotecas construidas, en las que sí existió gran semejanza entre los filos presentes en las mismas (Figura 5.13).

Por otra parte, este análisis mostró un patrón de bandas coincidente entre las bacterias totales (ADN) y las metabólicamente activas (ARN) de los cultivos de enriquecimiento de cada una de las muestras, como se comprobó en los perfiles 2-3, 5-6, 9-10 y 11-12 de la Figura 5.23. Por este motivo se decidió estudiar en profundidad únicamente la comunidad bacteriana total de cada cultivo, ya que resultaban esperables unos resultados prácticamente idénticos entre la comunidad total de bacterias y la metabólicamente activa para cada uno de ellos. De hecho, justamente fue lo que sucedió con los cultivos de enriquecimiento de las muestras de los depósitos negros de Oporto (Capítulo 3), en las que ambas comunidades mostraron una distribución de filos casi exacta.

Otro aspecto que llamó la atención fue que, a pesar de que los patrones de bandas de las muestras naturales de los mucolitos fueron muy similares, en los cultivos de enriquecimiento sí se observaron muchas diferencias entre MZ04-4 y MZ04-5 (Figura 5.23, perfiles 9 y 10 frente a 11 y 12) hecho que también se verificó en

las genotecas elaboradas de estas muestras (Figura 5.11 A y B), en las que únicamente el filo Firmicutes estuvo presente en ambas y con porcentajes muy dispares.

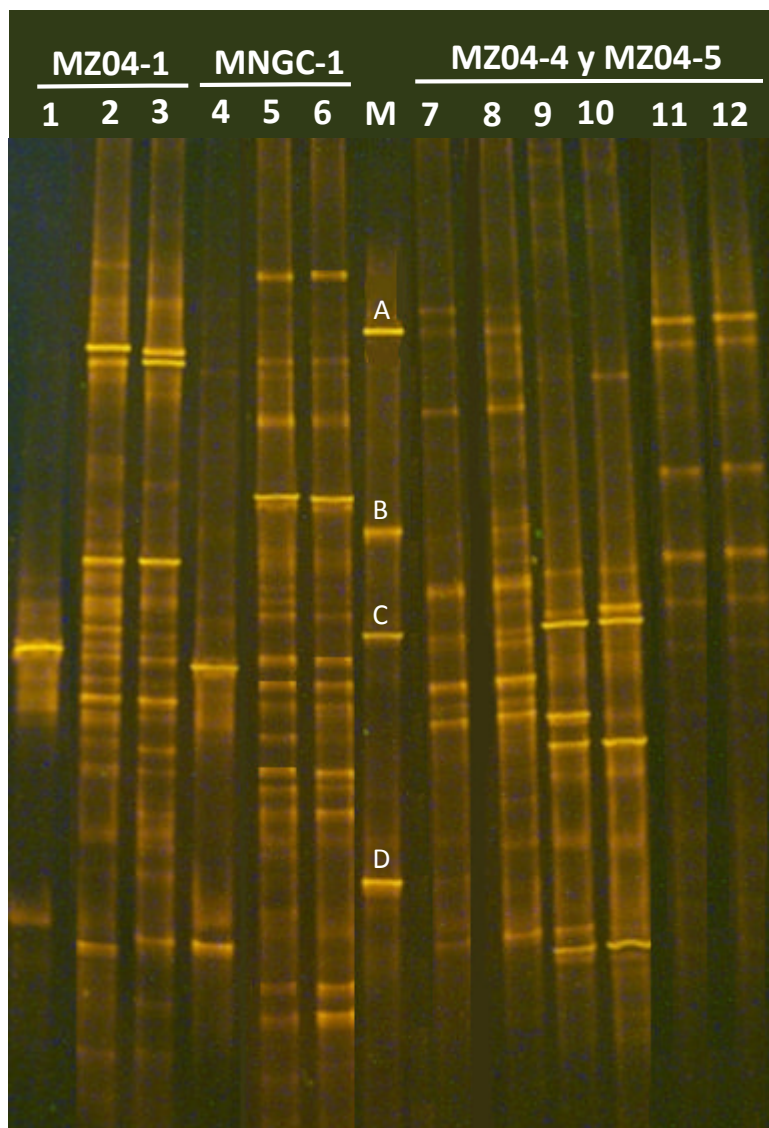


Figura 5.23 Análisis y comparación de las comunidades bacterianas de las muestras MZ04-1, MNGC-1, MZ04-4 y MZ04-5 de los tubos de lava de las Islas Canarias mediante DGGE con gradiente de desnaturalización 30-55%. Perfil M: marcador de electroforesis compuesto por *Pseudomonas* sp. (A), *Escherichia coli* (B), *Paenibacillus* sp. (C) y *Streptomyces* sp. (D). Perfiles de la muestra MZ04-1: 1 - ADN de la muestra natural. 2 - ADN del cultivo de enriquecimiento. 3 - ARN del mismo cultivo de enriquecimiento. Perfiles de la muestra MNGC-1: 4 - ADN de la muestra natural. 5 - ADN del cultivo de enriquecimiento. 6 - ARN del mismo cultivo de enriquecimiento. Perfiles de las muestras MZ04-4 y MZ04-5: 7 - ARN de la muestra natural MZ04-4. 8 - ARN de la muestra natural MZ04-5. 9 - ADN del cultivo de enriquecimiento de MZ04-5. 10 - ARN del cultivo de enriquecimiento de MZ04-5. 11 - ADN del cultivo de enriquecimiento de MZ04-4. 12 - ARN del cultivo de enriquecimiento de MZ04-4.

Como se puede comprobar, el análisis de las comunidades bacterianas mediante DGGE estuvo en consonancia con los datos obtenidos en la elaboración de genotecas.

5.4 DISCUSIÓN

5.4.1 ASPECTOS GENERALES DE LAS MUESTRAS DE LOS TUBOS DE LAVA ESTUDIADOS

A pesar de que las muestras analizadas poseían diferente naturaleza y origen, todas fueron recogidas en tubos de lava del archipiélago canario, habiéndose constatado la existencia de aspectos comunes entre ellas.

El primer aspecto, y uno de los más importantes, correspondió a los problemas de extracción de ácidos nucleicos surgidos durante el proceso de análisis de estas muestras, sin olvidar las amplificaciones infructuosas mediante PCR de los mismos en muchos casos. De hecho, no fue posible el estudio de la comunidad bacteriana metabólicamente activa en las muestras MZ04-1 y MNGC-1, ni la comunidad total en MZ04-4 y MZ04-5.

Teniendo en cuenta que la exploración de las comunidades bacterianas cada vez se apoya más en métodos moleculares en contraposición a los métodos tradicionales de cultivo, conviene entender los motivos que propiciaron las circunstancias indicadas. Herrera y Cockell (2007) ya anticiparon que la extracción de ADN de ambientes volcánicos resulta un desafío, debido a su diversidad y complejidad tanto química como física. Estos autores detectaron tres fenómenos provocados por la composición química de las muestras volcánicas que pueden limitar la eficacia de la extracción de ADN, los cuales no son completamente independientes unos de otros, consistentes en: (I) la unión del ADN con los componentes presentes de forma natural en la muestra, (II) el secuestro del ADN en una matriz mineral y (III) la degradación del propio ADN debida principalmente a condiciones ácidas.

Por ejemplo, en el caso de las muestras de la Cueva del Llano de los Caños, la presencia de gran cantidad de vegetación sobre la cavidad puede provocar que al introducirse el agua en su interior arrastre materia orgánica rica en ácidos húmicos, conocidos por ser inhibidores de las reacciones de PCR (Matheson y col., 2010). La naturaleza gelatinosa de las muestras recogidas en dicho tubo de lava apuntaron a este hecho, especialmente los depósitos negros MZ04-1, los cuales se encontraron asociados en todos los casos a las fracturas en la roca por las que penetraba el agua y otros componentes orgánicos provenientes del exterior.

Además, en cuanto a factores físicos, es preciso recordar que muchos ambientes volcánicos se caracterizan por una estructura rocosa muy dura, por lo que el tratamiento con cuentas de vidrio en el proceso de extracción de los ácidos nucleicos puede ser insuficiente para romperla y liberar las células bacterianas. Concretamente en el caso del basalto, el cual abunda en los tubos de lava de las Islas Canarias, el desafío de extracción implica lograr la liberación de los organismos a partir

de su textura vesicular y hacer frente a las altas concentraciones de hierro (Herrera y Cockell, 2007).

Tampoco hay que olvidar la posibilidad de que exista una interpretación errónea de los datos debido a la posible introducción de células contaminantes o ADNr durante los procedimientos experimentales (Tanner y col., 1998), un tema a tener muy en cuenta especialmente con esta clase de muestras de poca biomasa (Barton y col., 2006). Precisamente en el presente trabajo se detectó una circunstancia que podría ser atribuible a esta problemática: la presencia de *Propionibacterium acnes* en las genotecas de las muestras de la Cueva del Llano de los Caños (Tablas 5.3, 5.7 y 5.8), la cual fue anteriormente descrita como una cepa contaminante en la PCR (Tanner y col., 1998). Los bajos porcentajes que alcanzó en las genotecas (menor del 6% en todos los casos) y el hecho de que los filotipos identificados mediante BLAST mostraran mayor similitud con bacterias no cultivadas, hacen pensar que, efectivamente, se trata de una contaminación, aunque, por otra parte, el género *Propionibacterium* también se ha detectado en ambientes volcánicos de las Islas Canarias (Portillo y González, 2008).

El segundo aspecto común correspondió al hecho de que gran parte de las secuencias analizadas en las genotecas de estas muestras mostraron similitud con bacterias de ambientes no volcánicos. Esto fue debido probablemente a la escasez de secuencias procedentes de tubos de lava que se hallan actualmente en las bases de datos disponibles, ya que las comunidades microbianas de estos ambientes subterráneos no se empezaron a estudiar en profundidad hasta hace relativamente poco tiempo (Northup y Welbourn, 1997). También hay que tener en cuenta que en ninguna de las genotecas de las muestras naturales se pudo capturar toda la diversidad de especies presente, por lo que de un mayor número de secuenciaciones podría emerger un patrón aún más preciso.

El tercer aspecto común entre las muestras de los tubos de lava de las Islas Canarias fue atribuible al alto número de clones en las respectivas genotecas con una similitud menor del 95% con las secuencias depositadas en las bases de datos, lo que manifestó el enorme potencial de los ecosistemas conformados por los tubos de lava como fuentes de aislamiento de nuevas especies microbianas. Esta circunstancia también se presentó en los resultados obtenidos por Hathaway (2010), con el 92% de las secuencias de actinobacterias de los tubos de lava de Hawái y el 93% de las de los tubos de lava de Azores mostrando identidades menores del nivel de género con las secuencias de GenBank, así como en el trabajo de Riquelme y col. (2015), con un alto porcentaje de los clones poseyendo menos del 97% de similitud con secuencias conocidas y siendo los OTUs de tipo “singleton” los más comunes de todos los analizados. Por su parte, Kanokratana y col. (2004) detectaron un 80% de secuencias de ADNr 16S desconocidas en unos sedimentos de aguas termales. Todo ello pone de manifiesto el interés potencial en la exploración de este tipo de entornos.

La detección de filamentos reticulados (Melim y col., 2008) en todas las muestras estudiadas de la Cueva del Llano de los Caños y la Mina de los Cernícalos está relacionada también con la presencia en las muestras de microorganismos sin clasificación. Estos filamentos ya fueron revelados con anterioridad en otros tubos de lava: el sistema de cuevas de Kipuka Kanohina (Hawái) (Northup y col., 2011) y Ana Heva (Isla de Pascua, Chile) (Miller y col., 2014b). Teniendo también en cuenta la aparición de los filamentos en los dos tubos de lava de las Islas Canarias, es posible afirmar que los ambientes volcánicos son entornos en los que resulta factible localizar estos enigmáticos microorganismos. Los filamentos de los tubos de lava canarios mostraron el mismo comportamiento que los de las muestras de depósitos negros del túnel de Paranhos, con una escasísima viabilidad y vaciamiento de las vainas, sin la detección de indicios de que su crecimiento se haya producido en las condiciones de laboratorio. Como ya apuntaron Herrera y Cockell (2007), considerando la diversidad de los hábitats volcánicos y la gran variabilidad genética de los microorganismos, la inmensa mayoría de los que aún se ignoran en dichos hábitats podrían tratarse de microorganismos sin clasificar e incluso con estructuras moleculares desconocidas. Este caso es el de los filamentos reticulados, de los cuales se sigue sin conocer su naturaleza y origen. Por tanto, los tubos de lava de la Cueva del Llano de los Caños y la Mina de los Cernícalos representan un ambiente adecuado para la realización de estudios desde esta perspectiva.

Resulta además evidente que los métodos de cultivo son insuficientes para caracterizar a las especies bacterianas presentes en estas cavidades, ya que, como se puede comprobar en las Tablas 5.1, 5.4 y 5.9, apenas se obtuvieron aislamientos de las muestras estudiadas. Un motivo importante es que resulta muy difícil reproducir en el laboratorio las condiciones naturales concretas que precisan los microorganismos existentes en los entornos volcánicos para desarrollarse.

Los pocos aislamientos también estuvieron en consonancia con la escasez de bandas detectada en los análisis por DGGE de las muestras naturales MZ04-1 y MNGC-1 (Figura 5.23). De hecho, mediante FESEM no se observaron tantos microorganismos ni EPS como en otras muestras estudiadas en esta tesis. Podría deducirse, por tanto, que no contenían gran cantidad de bacterias, característica recurrente en esta clase de ambientes, ya que la posibilidad de la existencia de pocos grupos taxonómicos se descartó al demostrar los análisis de las genotecas que sí existía diversidad, a pesar de la escasez bacteriana.

5.4.2 MUESTRA DE DEPÓSITOS NEGROS ORGÁNICOS MZ04-1

De las características estudiadas de MZ04-1, hay una que llamó la atención poderosamente: la gran cantidad de secuencias de la genoteca de la muestra natural que poseían similitud con bacterias procedentes de ambientes vegetales (musgos acuáticos, suelos de praderas, arrozales, invernaderos, rizosfera, etc.). A modo de

ejemplo, la alfaproteobacteria *Phyllobacterium myrsinacearum* fue aislada de los nódulos de la hoja de *Ardisia crispa* (Mergaert y col., 2002). También se detectaron cloroplastos y mitocondrias de pinos y algas con los cebadores específicos de bacterias, recalcando aún más esta idea. A pesar de que muchos cebadores universales se han diseñado con el fin de amplificar los genes ARNr 16S bacterianos, algunos de ellos también amplifican genes eucariotas ARNr 18S y los genes ARNr 16S ARNr de mitocondrias y cloroplastos (Baker y col., 2003; Huys y col., 2008). Estos orgánulos celulares son descendientes evolutivos de las bacterias, por lo que no es sorprendente que sus respectivos genes ARNr 16S posean homología, convirtiendo en un desafío la elección de la pareja de cebadores apropiada para una reacción de amplificación determinada. Otro ejemplo de esta problemática son los cebadores específicos para cianobacterias (Cya106F –Cya781R), los cuales poseen homología con los cloroplastos de las algas clorofitas 16S (Dams y col., 1988; Rastogi y col., 2010), lo que lleva a amplificaciones inespecíficas de secuencias no bacterianas.

La poca profundidad de la Cueva del Llano de los Caños implica a su vez un contacto estrecho entre el interior de la cavidad y la vegetación de la superficie, como se pudo comprobar en las numerosas zonas de esta cueva con presencia de raíces. Como se especificó con anterioridad, los depósitos orgánicos negros de la muestra MZ04-1 estuvieron asociados a las fracturas de la pared del tubo de lava. La similitud con muchas bacterias de ambientes vegetales y la elevada detección de ADN de plantas en esta muestra demostró que, efectivamente, existe una influencia real por parte de las plantas existentes en la superficie. Debido a que la cueva se sitúa al pie de la montaña de La Horqueta, el agua de lluvia que se desliza por su ladera puede acabar filtrándose al interior de esta cueva superficial con facilidad, introduciendo en ella los elementos orgánicos detectados. Otro factor a tener en cuenta es la presencia en la superficie de pinos, como *Pinus canariensis*, en consonancia con las procedencias de los eucariotas amplificados. La influencia de las plantas sobre los tubos de lava fue también evidenciada en el estudio desarrollado en tubos de lava de Nuevo México por Snider (2010).

Es preciso indicar que, a pesar del incendio que afectó a la zona en el año 2012, ésta se encontró bastante recuperada en el momento del muestreo. Así, tanto la vegetación arbórea como arbustiva en las proximidades del tubo de lava sigue presente y conectada a la Cueva del Llano de los Caños.

De todas las muestras estudiadas de los tubos de lava canarios, es en MZ04-1 en la que se detectó un mayor porcentaje de bacterias sin clasificar, exactamente un cuarto de todas las secuencias obtenidas. Además, hubo una secuencia afiliada a la división candidata TM7, la cual es una de las nuevas divisiones bacterianas descritas, caracterizada exclusivamente por datos de secuencias ambientales (Hugenholtz y col., 1998), al menos hasta muy recientemente que se consiguió cultivar una de las especies

de este filo (He y col., 2014). TM7 fue propuesto originalmente en base a secuencias parciales de ARNr 16S obtenidas de genotecas de una turbera (Rheims y col., 1996), del suelo de un bosque (Borneman y Triplett, 1997) y del lodo de un reactor (Bond y col., 1995). También se detectó en tubos de lava de Azores, Hawái y Nuevo México, representando asimismo menos del 2% de las secuencias totales obtenidas (Snider 2010; Hathaway y col., 2014a), por lo que suele ser un grupo taxonómico recurrente en estos ambientes, debido a la gran cantidad de bacterias no cultivables que albergan.

En cuanto a los cultivos de enriquecimiento, los filos Firmicutes y Proteobacteria fueron los más detectados, los cuales también afiliaron a parte de las bacterias aisladas. Sin embargo, a pesar de que se aislaron cuatro cepas de Actinobacteria, ninguna fue detectada en el cultivo de enriquecimiento de esta muestra. La clara dominancia de Firmicutes manifestó que, a pesar de que constituyeron un filo minoritario en la genoteca de la muestra natural, encontraron unas condiciones idóneas para su desarrollo en el medio Rouf modificado.

Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Acidobacteria y Chloroflexi fueron algunos de los grupos taxonómicos más frecuentemente detectados en la genoteca de MZ04-1, además de otros menos representados como Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Cyanobacteria y Verrucomicrobia. Todos ellos ya se habían identificado con anterioridad en otros tubos de lava (Northup y col., 2008; Garcia y col., 2009). De hecho, los más abundantes en los de Hawái y Nuevo México, estudiados por Moya y col. (2009) y Garcia y col. (2009), correspondieron a Gammaproteobacteria, Actinobacteria y Acidobacteria, un esquema similar al detectado en el tubo de lava canario, aunque sin olvidar que en la muestra MZ04-1 no existieron diferencias muy marcadas en las diferentes abundancias bacterianas.

También es destacable la presencia de clones relacionados con bacterias oxidantes de hierro y manganeso como los géneros *Hyphomicrobium* y *Pedomicrobium* (Moore, 1981; Gebers y Beese, 1998), tanto en la genoteca de la muestra natural como en la de los cultivos de enriquecimiento. La riqueza en hierro de la muestra, corroborada mediante la observación de agregados minerales al microscopio y de precipitados de color marrón en el cultivo de enriquecimiento, pudieron favorecer el desarrollo en el tubo de lava de estas bacterias oxidantes, llevando a cabo reacciones de precipitación de óxidos de hierro. La especie *Pedomicrobium australicum* también fue detectada en los tubos de lava de Nuevo México estudiados por Snider (2010).

5.4.3 MUESTRAS DE MUCOLITOS MZ04-4 y MZ04-5

Las muestras de mucolitos de la Cueva del Llano de los Caños presentaron tanto similitudes como diferencias entre sí.

La distribución de los filos bacterianos en ambas muestras naturales fue casi idéntica, como se comprobó en las genotecas elaboradas y en sus patrones de bandas de DGGE, hecho probablemente atribuible a una composición común, ya que ambas poseían riqueza en hierro y aluminio y el mismo aspecto, además de gran cercanía en las posiciones que ocupaban en el interior del tubo de lava (la MZ04-4 en el techo y la MZ04-5 en la pared del mismo punto de muestreo). Asimismo, en los dos mucolitos las bacterias detectadas también provinieron en su mayoría de entornos vegetales, como semillas, néctares florales y raíces. Este hecho concuerda con los datos de la muestra MZ04-1. Teniendo en cuenta que los mucolitos y los depósitos orgánicos negros fueron muestreados en el mismo tubo de lava, existen indicios para pensar que las muestras analizadas poseen un aporte considerable de materia orgánica de la vegetación que percola de la superficie a través de fracturas en la roca, la cual puede constituir a su vez una valiosa fuente de energía para los microorganismos de la cavidad (Miller y col., 2016). Por otra parte, Daza Brunet y Bustillo Revuelta (2014) ya apuntaron que las acumulaciones de materiales vegetales infiltradas en las cuevas pueden contribuir a la formación de espeleotemas.

Por el contrario, resultó sorprendente la distribución dispar de filos que se observó en las genotecas de los cultivos de enriquecimiento de estas muestras, con solamente Firmicutes como filo común. Es decir, aunque inicialmente en las dos muestras naturales de mucolitos analizadas no existían unas diferencias muy marcadas en sus respectivas comunidades bacterianas, el proceso de cultivo incentivó el crecimiento de distintos microorganismos en cada caso. Aunque ambas muestras poseían una composición muy similar, una teórica mayor riqueza en elementos metálicos de la muestra MZ04-5 pudo generar la detección en el cultivo de muchas bacterias no cultivadas procedentes de la industria metalúrgica. En este mismo cultivo también se detectaron muchas bacterias procedentes de plantas, al igual que en la muestra natural, mientras que en MZ04-4 fueron mayoritarias las bacterias de diferentes tipos de sedimentos. También es resaltable el hecho de que la distribución de las comunidades del cultivo de enriquecimiento de la muestra MZ04-4 fue muy similar a la que se observó en el de MZ04-1, con los Firmicutes como filo claramente predominante, indicando este hecho que las bacterias desarrolladas en estos cultivos han sido semejantes entre estas dos muestras de la misma cueva. Las bacterias aisladas de los mucolitos también pertenecieron a los mismos filos que las de la muestra de depósitos orgánicos MZ04-1, únicamente variando en los porcentajes de abundancia. Tiene sentido que estas muestras posean características comunes al coexistir en el mismo ambiente subterráneo.

Es importante mencionar que la distribución de filos en las muestras siempre se ha de tratar en términos de abundancia relativa, puesto que los datos de las genotecas no provienen de técnicas cuantitativas. Las PCR pueden no reflejar la verdadera abundancia del ADN molde por diferencias en la unión de los cebadores y la eficiencia del proceso de elongación (Hughes y col., 2001).

Por otra parte, en la genoteca de la muestra natural MZ04-4 se detectó la especie *Pelosinus fermentans*, perteneciente al filo Firmicutes, la cual fue la más frecuente en el cultivo de enriquecimiento de la misma muestra, por lo que en este caso se lograron cultivar algunos de los microorganismos presentes inicialmente en el mucolito objeto de estudio.

En las muestras naturales de mucolitos también se detectaron algunas bacterias afiliadas a Bacteroidetes, Planctomycetes, Armatimonadetes, Chloroflexi, Gemmatimonadetes y Verrucomicrobia. Los tres primeros son filos comunes en ambientes subterráneos, como cuevas y reservorios de aguas subterráneas (Cuezva y col., 2012; De Leo y col., 2012; Zhang y col., 2015). Además, todos ellos fueron identificados en tubos de lava con anterioridad (Northup y col., 2008; Garcia y col., 2009). Asimismo, el filo Actinobacteria tuvo una buena representación en ambas muestras, pero no llegó a ser el mayoritario, situación no coincidente con la de otros tubos de lava. Por ejemplo, Garcia y col. (2009) y Riquelme y col. (2015) comprobaron que el filo Actinobacteria fue claramente dominante en casi todos los tubos volcánicos que analizaron.

La especie *Advenella kashmirensis* formó parte de la comunidad metabólicamente activa de las dos muestras de mucolitos, mostrando porcentajes de similitud muy elevados. Esta betaproteobacteria quimiolitotrofa oxidante de azufre (Ghosh y col., 2011) se ha aislado también de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (Sopeña y col. 2014).

También, en las genotecas de las muestras naturales, se detectaron bacterias de ambientes no volcánicos, pero de características relacionadas. Por ejemplo, las secuencias de *Caulobacter*, afiliado a la clase Alphaproteobacteria, se detectó en porcentajes considerables en ambas muestras (6,6% en MZ04-4 y 14,6% en MZ04-5), comprendiendo bacterias especializadas en ambientes oligotróficos (Abraham y col., 1999).

Al igual que en los depósitos de ferromanganeso del túnel de Paranhos (Capítulo 3) y de la Mina das Azeleiras (Capítulo 4), también se detectaron bacterias del género *Cupriavidus* en la muestra MZ04-4 (5,5% de las secuencias de la genoteca de la muestra natural), poniendo de manifiesto de nuevo que existían algunas comunidades bacterianas comunes entre estos ambientes. La resistencia a metales y el

metabolismo oxidativo de estas bacterias (Vandamme y Coenye, 2004) han podido ser factores clave en su desarrollo en la muestra MZ04-4, rica en aluminio y hierro.

También es destacable la presencia en las genotecas de ambas muestras naturales de la especie *Aquabacterium commune*, perteneciente a la familia *Comamonadaceae*. Esta misma cepa también se detectó en los depósitos de ferromanganeso del túnel de Paranhos.

5.4.4 MUESTRA DE DEPÓSITOS NEGROS DE FERROMANGANESO MNGC-1

Los agregados reticulados observados en esta muestra mediante FESEM, poseían la morfología típica de los óxidos de manganeso biogénicos (Figura 5.21), descrita por Friedrich y col. (2011) y Miller y col. (2012a), al igual que en las otras muestras de depósitos de ferromanganeso estudiadas en esta tesis (Capítulos 3 y 4).

En el cultivo de enriquecimiento, el filo Firmicutes fue predominante, al igual que ocurrió con los de las muestras MZ04-1 y MZ04-4, por lo que ha tenido un comportamiento similar al de otras muestras de los tubos de lava.

Actinobacteria alcanzó muy buena representación en la genoteca de la muestra natural MNGC-1, pero aun así no llegó a ser el filo dominante, contrastando de nuevo con los datos de tubos de lava anteriormente analizados (García y col., 2009; Riquelme y col., 2015). Otros filos frecuentes en tubos de lava, como Acidobacteria, Proteobacteria, Chloroflexi, Nitrospirae, Firmicutes, Verrucomicrobia, Planctomycetes y Gemmatimonadetes (García y col., 2009) encontraron representación en esta muestra. Además, Actinobacteria, Proteobacteria y Acidobacteria, junto al filo Cyanobacteria detectado en el cultivo de enriquecimiento, también fueron identificados en otros terrenos volcánicos de Hawái (Gómez-Alvarez y col., 2007).

También es preciso resaltar que en esta muestra natural fue en la que existió una mayor representación de bacterias no cultivadas procedentes de biofilms microbianos y depósitos orgánicos presentes en tubos de lava, con casi un 25% de todas las secuencias analizadas.

En esta muestra de depósitos negros, se detectó una secuencia relacionada con el género *Nitrospira*, cuya identificación más cercana fue la especie quimiolitotrófica obligada *Nitrospira moscoviensis* (Ehrich y col., 1995), con un 95% de similitud. Esta especie fue detectada en tubos de lava de Nuevo México (Snider, 2010) y en la muestra de depósitos de ferromanganeso del túnel de Paranhos (Capítulo 3).

En la genoteca de la muestra natural MNGC-1, dentro de la clase Alphaproteobacteria, *Hyphomicrobium* y *Pedomicrobium* estuvieron entre los géneros más abundantes. Tres cepas se afiliaron a la especie *Pedomicrobium manganicum* y

dos a *Pedomicrobium australicum*, bacterias conocidas por su capacidad de oxidar el hierro y el manganeso (Cox y Sly, 1997; Gebers y Beese, 1988), junto a diversas especies de *Hyphomicrobium* (Moore, 1981). Todo ello, sumado a la obtención de una leve banda en el análisis del gen *mofA*, indica que existe actividad oxidante en esta muestra, de manera que alguna de estas especies podrían estar implicadas en la formación de los depósitos de óxidos de ferromanganeso, idea sustentada también por la observación mediante FESEM de la estructura característica de óxidos de manganeso biogénicos. Además, la asociación de los filamentos reticulados a estos depósitos, indica que dichos filamentos podrían estar llevando a cabo procesos de biomineralización en la Mina de los Cernícalos, al igual que otras bacterias detectadas.

Por lo tanto, la presencia de estas bacterias en los depósitos de ferromanganeso investigados podría ser indicativa de que se encuentran envueltas en el proceso biogeoquímico que en última instancia conducen a la deposición de óxidos de ferromanganeso en la Mina de los Cernícalos, como ocurre en otras cavidades con esta clase de precipitados, como la Cueva Vântului en Rumanía (Manolache y Onac, 2000) o en el túnel de Paranhos estudiado en esta tesis.

CAPÍTULO 6

**TUBOS DE LAVA DE LAS ISLAS
GALÁPAGOS (ECUADOR)**

6.1 LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS TUBOS DE LAVA

Las Islas Galápagos son un archipiélago de islas volcánicas situadas en el Océano Pacífico, a unos 1000 km de distancia al oeste de las costas continentales de Ecuador (Figura 6.1). Está conformado por 7 islas con una superficie mayor de 100 km² (Isabela, Santa Cruz, Fernandina, Santiago, San Cristóbal, Floreana y Marchena), 12 islas más pequeñas de entre 60 y 11 km² (Pinta, Española, Baltra, Santa Fe, Pinzón, Genovesa, Rábida, Wolf, Darwin, Seymour Norte, Tortuga y Bartolomé) y una gran cantidad de islotes y rocas de unos pocos metros cuadrados (Gallardo y Toulkeridis, 2008).



Figura 6.1 Localización de las Islas Galápagos, a una distancia aproximada de 1000 km respecto a las costas de Ecuador, con detalle del archipiélago. Fuente: Google maps.

El aislamiento extremo de estas islas oceánicas, a causa de su distancia y falta de relación con respecto al continente, provocó que la flora y la fauna existentes evolucionaran de forma excepcional, representando un ecosistema único en la Tierra y un auténtico espectáculo de biodiversidad (Mejía y Brandt, 2015). Gracias a este laboratorio natural, Charles Darwin llegó incluso a formular su teoría de la evolución por la selección natural de las especies, tras su visita a las islas en 1835.

Se estiman al menos 7000 especies en el archipiélago, de las cuales el 97% de los reptiles y los mamíferos, el 80% de las aves no voladoras, el 50% de los insectos y el 30% de las plantas son endémicas (Rogg y col., 2005). Entre las especies animales endémicas de singular importancia que habitan las islas se incluyen las tortugas Galápagos, las iguanas terrestres y marinas, el león marino de las Galápagos, los

pinzones de Darwin, el piquero de patas azules, el pingüino de las Galápagos, el pelícano pardo, etc.

La Unesco declaró a las Islas Galápagos como Patrimonio Natural de la Humanidad en 1979 y como Reserva de la Biosfera en 1985. También estuvieron incluidas en la Lista del Patrimonio de la Humanidad en Peligro hasta el año 2010.

Se estima que las islas más longevas del archipiélago se originaron hace 8 millones de años como resultado de la actividad volcánica en el fondo marino (Espinasa y col., 2015). Representa una de las zonas volcánicas más activas del mundo (Gallardo y Toulkeridis, 2008), como demuestra el hecho de que la última erupción registrada en la zona fue la del volcán Wolf, en la Isla Isabela, en 2015. Las frecuentes erupciones de estos volcanes se caracterizan por una actividad de tipo efusiva con la generación de grandes flujos de lava basáltica, en muchos casos llegando hasta el mar.

Existen además grandes tubos de lava subterráneos que perforan las islas, ricos en una amplia variedad de espeleotemas, como: coraloides, estalactitas, estalagmitas, espeleotemas botrioidales, moonmilk, gours, etc. Los componentes de dichos depósitos de minerales secundarios suelen ser plagioclasas y piroxenos, típicos de las rocas volcánicas, silicatos, minerales de óxidos de hierro, minerales de la arcilla, carbonatos y sulfatos. Todos ellos están influenciados en mayor o menor medida por el microclima húmedo extremo de las Islas Galápagos (Daza y col., 2016).



Figura 6.2 Localización de los tubos de lava de la Isla Santa Cruz estudiados en esta tesis. 1. Cueva de Bellavista. 2. Tubo de lava Royal Palm.

La Cueva de Bellavista, también conocida como Cueva de Gallardo y Túneles del Amor, se localiza en la parte este de la isla de Santa Cruz, a 1,1 km al noroeste de la población de Bellavista y a 6,8 km al norte de Puerto Ayora (Figura 6.2). Es un tubo de lava de amplias dimensiones, carente de ramificaciones laterales y pisos superiores (Figura 6.3 A y B). Con 2250 m de longitud, ostenta el privilegio de ser la segunda cavidad volcánica más larga en América del Sur. En su recorrido, alcanza valores máximos de 9,8 m de altura y 17,8 m de anchura. Es posible contabilizar hasta seis puntos de contacto con el exterior, generados por colapsos del techo de la cavidad. El tramo inicial de este tubo de lava, de aproximadamente un kilómetro, se utiliza para visitas turísticas, debido a su fácil acceso (Gallardo y Toulkeridis, 2008).

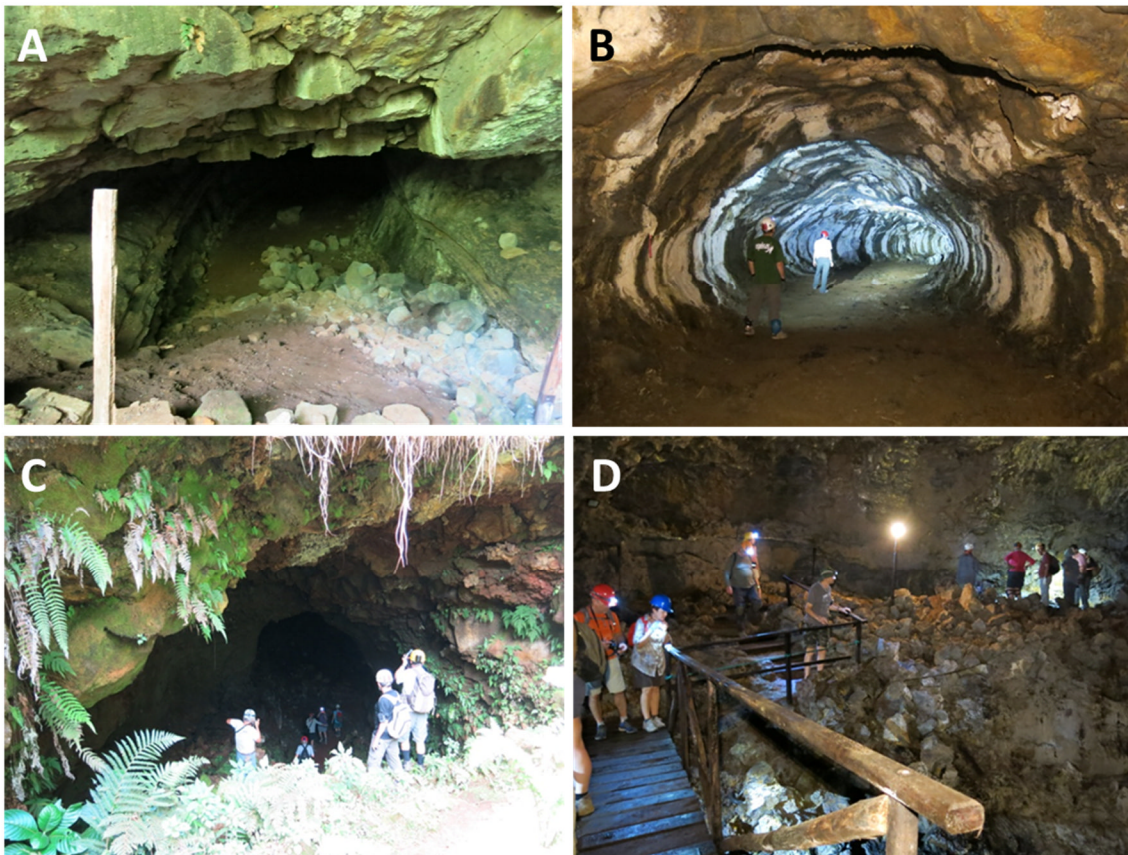


Figura 6.3 Fotografías de los tubos de lava de la Isla Santa Cruz. A. Entrada de la Cueva de Bellavista. B. Vista general del interior de la Cueva de Bellavista. C. Entrada del tubo de lava Royal Palm. D. Interior del tubo de lava Royal Palm, en el que se observa un recorrido adaptado para el turismo mediante pasarelas y barandillas.

La entrada a la Cueva de Bellavista fue descubierta en la década de los 60 por dos colonos que buscaban pozos de agua: el Sr. José Pesantes y el Profesor José A. Gallardo. Las visitas al tubo de lava se fueron multiplicando con el paso de los años y surgió la idea de convertirlo en destino turístico. En 1975, la Expedición “Galápagos 75” logró recorrerlo en su totalidad, revelando por tanto el desarrollo completo del tubo de lava (Gallardo y Toulkeridis, 2008). También descubrieron que los depósitos minerales en la cueva contenían principalmente yeso y calcita, los cuales sufrieron

diversas transformaciones a temperaturas muy altas en el pasado, oscilando entre 150 y 380°C (Gallardo y Toulkeridis, 2008). La Cueva de Bellavista es una cavidad húmeda, en la que se puede observar que el agua penetra en varios lugares del túnel desde el techo. Por otra parte, el aire circula libremente a lo largo del tubo de lava por tener abiertos ambos extremos. La temperatura en el interior oscila entre 20°C y 23°C.

En la parte oeste de la Isla Santa Cruz se localiza el tubo de lava Royal Palm, cerca de la localidad de Santa Rosa y adyacente al Parque Nacional de Galápagos (Figura 6.2). Cuenta con 600 m de longitud y un tamaño medio de entre 5 y 15 m de altura y entre unos 2 y 10 m de anchura. Es una cavidad gestionada por el “Royal Palm Hotel” para uso turístico (Figura 6.3 C y D) (Daza y col., 2016). Precisamente por su condición de propiedad privada, no existe mucha información accesible sobre su descubrimiento y topografía, aunque sí está recogido entre las cuevas volcánicas de la Isla Santa Cruz (Gallardo y Toulkeridis, 1998). Una característica resaltable es la de ser un tubo de lava especialmente rico en coraloideas.

6.2 LOCALIZACIÓN Y RECOGIDA DE MUESTRAS

En marzo de 2014, un grupo de geólogos de la Universidad de Almería y de la Universidad de las Fuerzas Armadas (Ecuador) llevaron a cabo una extensa campaña de muestreo en las Islas Galápagos y suministraron muestras al grupo de Microbiología Ambiental del IRNAS. Concretamente, en esta tesis se analizaron muestras de espeleotemas de los tubos de lava de la Isla Santa Cruz, con el objetivo de caracterizar su morfología, identificar los microorganismos presentes y extraer información sobre las interacciones microbio-mineral.

Por una parte, sobre las paredes de la Cueva de Bellavista, se observaron espeleotemas de tipo moonmilk, de color blanco y textura pastosa (Figura 6.4 A). Estos depósitos de minerales secundarios de naturaleza arborescente y porosa, se hallaron asociados al agua de escorrentía, de manera que sufrían un cambio de color de blanco a beige en el caso de estar mojados. A las muestras de moonmilk tomadas de este tubo volcánico se les asignó la denominación de Bella 1 (Figura 6.4 B).

Asimismo, en el tubo de lava Royal Palm, se muestrearon coraloideas de tonos grisáceos, beiges y pátinas blancas, desarrollados a lo largo de la cavidad. Dichos coraloideas poseían además pequeño tamaño: únicamente unos pocos centímetros de longitud y menos de 0,5 cm de diámetro (Figura 6.4 C). Estas muestras de coraloideas se denominaron Royal 2 (Figura 6.4 D).

Todas las muestras recogidas en los tubos de lava de la Isla Santa Cruz se analizaron mediante técnicas moleculares, con la construcción de genotecas, y mediante FESEM.

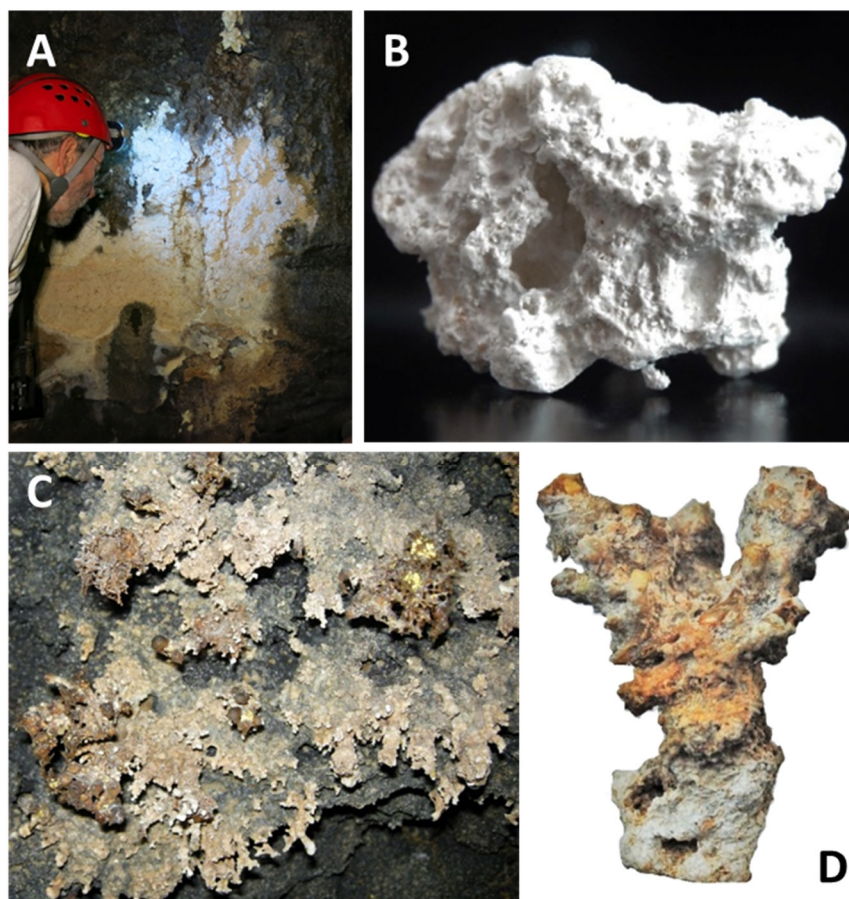


Figura 6.4 Muestras estudiadas de las Islas Galápagos. A. Moonmilk presente en la pared de la Cueva de Bellavista. B. Detalle de la muestra de moonmilk, denominada Bella 1. C. Coraloides del tubo de lava Royal Palm. D. Detalle de la muestra de coraloides Royal 2.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS DE LAS MUESTRAS NATURALES BELLA 1 Y ROYAL 2 MEDIANTE LA CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS DE ADN

De las muestras naturales de espeleotemas de los tubos de lava de la Isla Santa Cruz, se obtuvieron un total de 190 secuencias libres de quimeras, con las que se construyeron genotecas independientes de ADN de cada una de ellas, con el objetivo de detectar las bacterias totales presentes en estas muestras objeto de estudio.

La distribución de los diferentes filos bacterianos en las muestras de moonmilk y coraloides se observa en la Figura 6.5. El filo Gemmatimonadetes fue el más abundante en la muestra Bella 1 y el segundo mejor representado en la muestra Royal 2, abarcando un 10 % y un 19% del total de secuencias, respectivamente.

El filo que ocupó la primera posición en términos de abundancia en Royal 2 correspondió a Actinobacteria, representado con un 27%, mientras que en la muestra de moonmilk dicho filo sólo alcanzó el 1% del total.

Otros grupos taxonómicos con buena representación fueron: Firmicutes (6% en Bella 1 y 10% en Royal 2), Alphaproteobacteria (4% en Bella 1 y 13% en Royal 2) y Acidobacteria (2% en Bella 1 y 6% en Royal 2). En la muestra Royal 2, también se detectaron con pequeños porcentajes las clases Deltaproteobacteria (4%), Gammaproteobacteria (3%) y el filo Chloroflexi (2%).

A su vez, se identificaron otros grupos taxonómicos representados con solamente un 1% del total de secuencias cada uno. En la muestra Bella 1 fueron Betaproteobacteria, Bacteroidetes y Gammaproteobacteria, además de Actinobacteria. Por su parte, en Royal 2 correspondieron a los filos Planctomycetes, Nitrospirae, Thermodesulfobacteria y a la clase Betaproteobacteria, siendo esta última el único grupo taxonómico minoritario coincidente con los detectados en la muestra Bella 1.

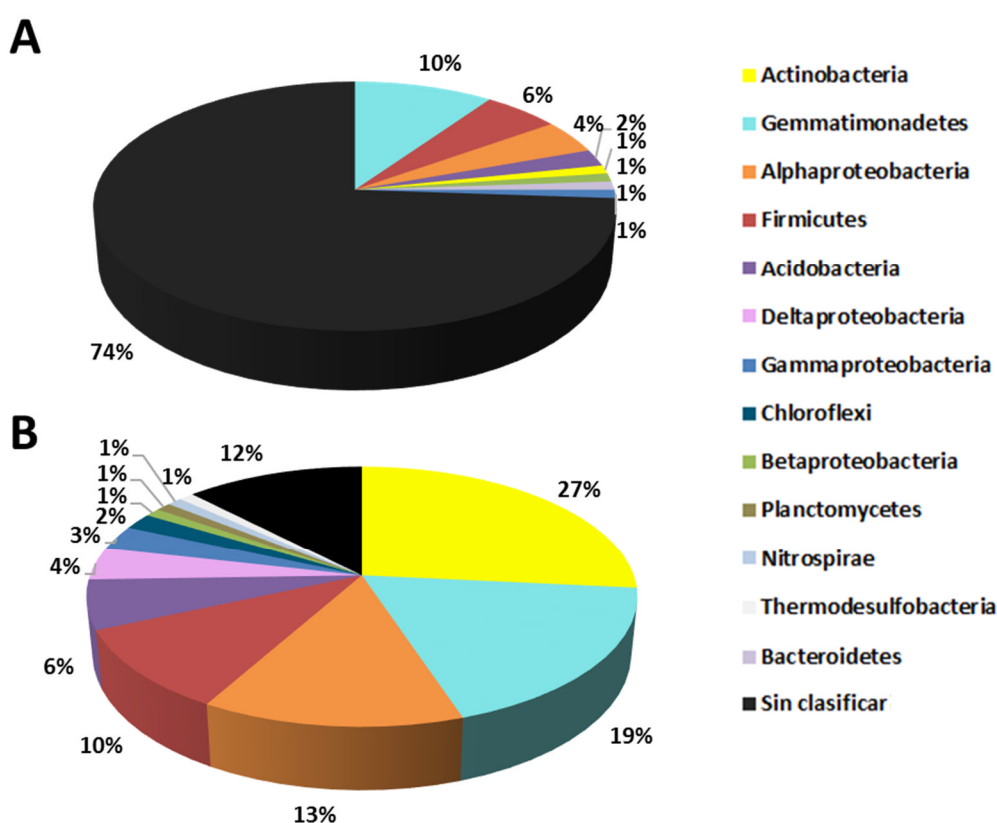


Figura 6.5 Distribución de las secuencias de las genotecas de ADN correspondientes a las muestras de los tubos de lava de las Islas Galápagos. A. Muestra Bella 1. B. Muestra Royal 2.

Es preciso resaltar que, como se observa en la Figura 6.5 A, hubo un 74% de bacterias de la muestra de moonmilk sin clasificación, ya que su similitud fue menor del 80% usando la base de datos Eztaxon (bacterias cultivables), hecho que no permitió su afiliación. En la muestra de coralloides, el porcentaje de bacterias sin clasificar alcanzó un 12% (Figura 6.5 B), un valor muy inferior respecto al existente en Bella 1.

Las identificaciones de las 190 secuencias obtenidas de las muestras de los tubos de lava de las Islas Galápagos se presentan en las Tablas 6.1 y 6.2. Las secuencias correspondientes a las bacterias totales se distribuyeron en 91 OTUs para la muestra Bella 1 (Tabla 6.1) y en 92 OTUs para Royal 2 (Tabla 6.2).

En la muestra de moonmilk, el filo Firmicutes estuvo representado por la especie *Bacillus mycoides*, mientras que la clase Alphaproteobacteria tuvo como especie representativa a *Mesorhizobium amorphae* (2,2%). Los grupos taxonómicos minoritarios de Actinobacteria, Betaproteobacteria, Bacteroidetes y Gammaproteobacteria contuvieron una sola secuencia cada uno, pero la única identificación posible fue la especie *Lysobacter yangpyeongensis*, afiliada a la clase Gammaproteobacteria, debido a que alcanzó un 97% de similitud.

Por otra parte, en la muestra de coraloideas el filo mayoritario correspondió a Actinobacteria, en el que se detectaron secuencias relacionadas con el género *Pseudonocardia* (con un 95% de similitud máxima), y con *Aciditerrimonas* sp. (98% de similitud). El resto de las identificaciones más cercanas de este filo presentaron similitudes menores del 94% que no permiten una adscripción a géneros o especies.

En lo que respecta a la clase Alphaproteobacteria de la muestra Royal 2, la especie más detectada fue *Methylocapsa aurea* (5,1%), junto a otras destacables como *Hyphomicrobium zavarzinii*, *Beijerinckia derxii* subsp. *venezuelae* y *Phenylobacterium haematophilum* y el género *Methyloceanibacter*. El filo Firmicutes estuvo representado por *Ammoniphilus* sp. (99% de similitud) y *Paenibacillus* sp. (95% de similitud). Por último, de los grupos taxonómicos minoritarios de la muestra Royal 2 únicamente se pudo identificar la especie *Ralstonia pickettii* en Betaproteobacteria.

Las secuencias de otros filos y clases de ambas muestras presentaron porcentajes de similitud muy bajos, menores del 90% en muchas ocasiones, que únicamente permitieron una clasificación como bacterias no cultivadas.

Las bacterias sin clasificar de Bella 1 y Royal 2 presentaron porcentajes de similitud menores del 80% con respecto a las existentes en la base de datos EZtaxon. Por este motivo, las cepas aisladas más cercanas no se indicaron en las Tablas 6.1 y 6.2., mostrándose en estos casos sólo la identificación correspondiente al homólogo no cultivable más cercano de la base de datos del NCBI.

Las secuencias obtenidas de las muestras de espeleotemas de las Islas Galápagos y sus identificaciones se analizaron según su procedencia, atendiendo a los datos del NCBI (Tablas 6.1 y 6.2).

En la muestra de moonmilk, la mayoría correspondió a bacterias procedentes de diferentes tipos de suelos (51,1% del total) y sedimentos subterráneos (22,8%). Un 8,7% de los clones secuenciados mostraron similitudes con bacterias aisladas de

estalagmitas y cavidades subterráneas como acuíferos, tumbas etruscas, la Cueva de Ardales (Málaga) y la Cueva Mumyo-ana (Japón); un 6,5% con bacterias procedentes de la rizosfera y un 5,5% con bacterias de biofilms, entre los que destacan aquellos presentes en la pared de tubos de lava. El 5,4% restante englobó a las fuentes de aislamiento menos frecuentes de la Tabla 6.1.

En la muestra de coraloides, un 38,8% del total de bacterias mostraron similitud con bacterias procedentes de biofilms microbianos presentes en tubos de lava. El 35,7% se atribuyó a bacterias de suelos y sedimentos subterráneos, siendo la segunda procedencia más frecuente. Los acuíferos y el agua subterránea (6,1%), otros tipos de biofilms (3,1%) y los ambientes subterráneos representados por las Cavernas Kartchner (EE.UU.), la Cueva Roraima Sur (Venezuela) y las tumbas subterráneas de la Necrópolis de Carmona (Sevilla) (4,1%) fueron otras fuentes de aislamiento frecuentes. Finalmente, un 12,2% correspondió a bacterias de ambientes menos representados, entre los que destacan las fumarolas por ser de naturaleza volcánica (Tabla 6.2).

Tabla 6.1 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias totales obtenidas de la muestra Bella 1 (92 secuencias, 91 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Gemmatimonadetes						
BellaADN-E11	2	Bacteria no cultivada (JQ427306)	Suelo	94	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	87
BellaADN-A9	1	Bacteria no cultivada (JQ427306)	Suelo	92	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	81
BellaADN-G10	1	Bacteria no cultivada (JQ427306)	Suelo	94	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	83
BellaADN-H3	1	Bacteria no cultivada (JQ427306)	Suelo	93	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	82
BellaADN-B12	1	Bacteria no cultivada (JQ427306)	Suelo	93	<i>Gemmatimonas phototrophica</i> (CP011454)	88
BellaADN-B8	1	Bacteria no cultivada (JQ427306)	Suelo	93	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	83
BellaADN-A3	1	Bacteria no cultivada (JQ427306)	Suelo	93	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	83
BellaADN-A12	1	Bacteria no cultivada (JQ427306)	Suelo	93	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	83
Firmicutes						
BellaADN-A10	1	Bacteria no cultivada (HM186898)	Sedimento subterráneo	94	<i>Calditerricola yamamurae</i> (AB308475)	80
BellaADN-A4	1	Bacteria no cultivada (HM186898)	Sedimento subterráneo	94	<i>Calditerricola yamamurae</i> (AB308475)	82
BellaADN-A6	1	Firmicutes no cultivado (AB666161)	Cueva Mumyo-ana	90	<i>Calditerricola satsumensis</i> (AB250968)	80
BellaADN-B6	1	<i>Bacillus mycoides</i> (LN774166)	Muestra de aire	98	<i>Bacillus mycoides</i> (ACMU01000002)	97
BellaADN-H8	1	Bacteria no cultivada (HM187012)	Sedimento subterráneo	95	<i>Heliophilum fasciatum</i> (L36197)	80
Alphaproteobacteria						
BellaADN-B11	1	<i>Mesorhizobium</i> sp. (KP219135)	Nódulo de raíz	99	<i>Mesorhizobium amorphae</i> (AF041442)	97
BellaADN-D3	1	<i>Mesorhizobium</i> sp. (KP219135)	Nódulo de raíz	99	<i>Mesorhizobium amorphae</i> (AF041442)	99
BellaADN-G8	1	Rhizobiales no cultivado (HM592561)	Estalagmita	95	<i>Amphiplicatus metriotheophilus</i> (KF153051)	81
BellaADN-E6	1	Bacteria no cultivada (FN995833)	Suelo agrícola	92	<i>Methyloceanibacter caenitepidi</i> (AB794104)	88
Acidobacteria						
BellaADN-D6	1	Bacteria no cultivada (EU132015)	Suelo de pradera	94	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	81
BellaADN-F2	1	Acidobacteria no cultivada (JQ401031)	Suelo	91	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	80
Actinobacteria						
BellaADN-C10	1	Bacteria no cultivada (EU133028)	Sedimento subterráneo	91	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	84
Betaproteobacteria						
BellaADN-E10	1	<i>Advenella kashmirensis</i> (KU180442)	Biofilm en agua potable	95	<i>Advenella kashmirensis</i> (CP003555)	85
Bacteroidetes						

Capítulo 6

BellaADN-A8	1	Bacteria no cultivada (HM186231)	Sedimento subterráneo	96	<i>Rhodothermus profundus</i> (FJ624399)	80
Gammaproteobacteria						
BellaADN-H1	1	<i>Lysobacter</i> sp. no cultivado (HM438541)	Suelo contaminado con antraceno	98	<i>Lysobacter yangpyeongensis</i> (DQ191179)	97
Bacterias sin clasificar*						
BellaADN-E7	1	Bacteria no cultivada (HM186978)	Sedimento subterráneo	97	-	-
BellaADN-E3	1	Bacteria no cultivada (HM187247)	Sedimento subterráneo	96	-	-
BellaADN-D7	1	Acidobacteria no cultivada (JQ401031)	Costra biológica del suelo	95	-	-
BellaADN-D9	1	Bacteria no cultivada (HM187012)	Suelo de pradera	92	-	-
BellaADN-D8	1	Bacteria no cultivada (HM187012)	Suelo de pradera	94	-	-
BellaADN-B3	1	Bacteria no cultivada (JN615946)	Biofilm en tubo de lava	94	-	-
BellaADN-H12	1	Bacteria no cultivada (HM186978)	Sedimento subterráneo	96	-	-
BellaADN-E2	1	Bacteria no cultivada (JQ428029)	Suelo	91	-	-
BellaADN-H9	1	Bacteria no cultivada (JQ428029)	Suelo	92	-	-
BellaADN-A11	1	Bacteria no cultivada (JQ428029)	Suelo	92	-	-
BellaADN-D12	1	Bacteria no cultivada (JQ428029)	Suelo	93	-	-
BellaADN-C12	1	Bacteria no cultivada (JQ428029)	Suelo	92	-	-
BellaADN-D11	1	Bacteria no cultivada (JQ428029)	Suelo	93	-	-
BellaADN-C11	1	Bacteria no cultivada (JQ428029)	Suelo	92	-	-
BellaADN-A2	1	Bacteria no cultivada (JQ427306)	Suelo	93	-	-
BellaADN-G3	1	Bacteria no cultivada (JQ428029)	Suelo	89	-	-
BellaADN-B4	1	Bacteria no cultivada (HM186891)	Sedimento subterráneo	87	-	-
BellaADN-G11	1	Bacteria no cultivada (KM205518)	Rizosfera	89	-	-
BellaADN-H7	1	Bacteria no cultivada (DQ906862)	Subsuelo	97	-	-
BellaADN-H4	1	Bacteria no cultivada (JQ428029)	Suelo	89	-	-
BellaADN-G7	1	Bacteria no cultivada (JQ428029)	Suelo	89	-	-
BellaADN-C5	1	Bacteria no cultivada (JQ428029)	Suelo	89	-	-
BellaADN-F7	1	Gammaproteobacteria no cultivada (EU810926)	Cueva de Ardales	97	-	-
BellaADN-A7	1	Acidobacteria no cultivada (HF584584)	Pinturas murales en tumbas etruscas	92	-	-
BellaADN-G12	1	Bacteria no cultivada (JN833536)	Acuífero	91	-	-

Tubos de lava de las Islas Galápagos (Ecuador)

BellaADN-E12	1	Bacteria no cultivada (JQ428029)	Suelo	92	-	-
BellaADN-H6	1	Bacteria no cultivada (KM205518)	Rizosfera	87	-	-
BellaADN-H5	1	Bacteria no cultivada (HM186978)	Sedimento subterráneo	89	-	-
BellaADN-H2	1	Bacteria no cultivada (JF417826)	Carbón	92	-	-
BellaADN-F10	1	Acidobacteria no cultivada (JQ401031)	Suelo	95	-	-
BellaADN-F3	1	Acidobacteria no cultivada (JQ401031)	Suelo	93	-	-
BellaADN-F8	1	Bacteria no cultivada (JF417826)	Carbón	93	-	-
BellaADN-F6	1	Acidobacteria no cultivada (JQ401031)	Suelo	92	-	-
BellaADN-F4	1	Bacteria no cultivada (JN833536)	Acuífero	94	-	-
BellaADN-C6	1	Bacteria no cultivada (JN833536)	Acuífero	96	-	-
BellaADN-H10	1	Bacteria no cultivada (HM186898)	Sedimento subterráneo	95	-	-
BellaADN-D10	1	Bacteria no cultivada (JF417826)	Carbón	94	-	-
BellaADN-C9	1	Acidobacteria no cultivada (JQ401031)	Suelo	95	-	-
BellaADN-C1	1	Acidobacteria no cultivada (JQ401031)	Suelo	89	-	-
BellaADN-F1	1	Acidobacteria no cultivada (JQ401031)	Suelo	93	-	-
BellaADN-E1	1	Acidobacteria no cultivada (JQ401031)	Suelo	93	-	-
BellaADN-G1	1	Bacteria no cultivada (KT460616)	Suelo	95	-	-
BellaADN-C4	1	Acidobacteria no cultivada (JQ401031)	Suelo	94	-	-
BellaADN-A5	1	Acidobacteria no cultivada (JQ401031)	Suelo	94	-	-
BellaADN-B10	1	Acidobacteria no cultivada (JF508315)	Suelo ártico	95	-	-
BellaADN-B1	1	Acidobacteria no cultivada (JQ401031)	Suelo	95	-	-
BellaADN-C8	1	Bacteria no cultivada (EU132183)	Suelo de pradera	91	-	-

Capítulo 6

BellaADN-F11	1	Acidobacteria no cultivada (JQ401031)	Suelo	93	-	-
BellaADN-G9	1	Bacteria no cultivada (HM186978)	Sedimento subterráneo	97	-	-
BellaADN-G5	1	Bacteria no cultivada (HM186978)	Sedimento subterráneo	93	-	-
BellaADN-G2	1	Bacteria no cultivada (HM185848)	Sedimento subterráneo	90	-	-
BellaADN-E9	1	Bacteria no cultivada (EU160012)	Suelo de rizosfera	93	-	-
BellaADN-E5	1	Bacteria no cultivada (HM186891)	Sedimento subterráneo	90	-	-
BellaADN-E4	1	Firmicutes no cultivado (AB666161)	Cueva Mumyo-ana	90	-	-
BellaADN-F12	1	Bacteria no cultivada (HM186898)	Sedimento subterráneo	89	-	-
BellaADN-D5	1	Bacteria no cultivada (HM186898)	Sedimento subterráneo	95	-	-
BellaADN-D2	1	Bacteria no cultivada (JN615946)	Biofilm en tubo de lava	94	-	-
BellaADN-C3	1	Bacteria no cultivada (JN615946)	Biofilm en tubo de lava	92	-	-
BellaADN-D4	1	Bacteria no cultivada (HM186978)	Sedimento subterráneo	91	-	-
BellaADN-E8	1	Bacteria no cultivada (JX504396)	Arena con oolitos calcáreos	88	-	-
BellaADN-D1	1	Bacteria no cultivada (KT905717)	Suelo	95	-	-
BellaADN-G4	1	Bacteria no cultivada (HG327363)	Suelo cultivable	95	-	-
BellaADN-C7	1	Bacteria no cultivada (HG327363)	Suelo cultivable	91	-	-
BellaADN-F5	1	Bacteria no cultivada (FJ479555)	Suelo de pradera	93	-	-
BellaADN-G6	1	Bacteria no cultivada (HM186898)	Sedimento subterráneo	92	-	-
BellaADN-B9	1	Bacteria no cultivada (EU160012)	Suelo de rizosfera	87	-	-
BellaADN-F9	1	Bacteria no cultivada (HM186421)	Sedimento subterráneo	86	-	-
BellaADN-B7	1	Bacteria no cultivada (HM186752)	Sedimento subterráneo	90	-	-

*No fue posible clasificar los OTUs con un porcentaje de similitud menor del 80% (EZtaxon), por lo que no se especifica la especie cultivada más cercana.

Tabla 6.2 Relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las bacterias totales obtenidas de la muestra Royal 2 (98 secuencias, 92 OTUs).

Clon representante	Nº de clones	Identificación molecular NCBI (nº acceso)	Procedencia	Similitud (%)	Identificación molecular EzTaxon (nº acceso)	Similitud (%)
Actinobacteria						
RoyalADN-A12	2	Bacteria no cultivada (EU132542)	Suelo de pradera	96	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	84
RoyalADN-C12	2	Bacteria no cultivada (JN615946)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	87
RoyalADN-C10	1	Bacteria no cultivada (JN417554)	Suelo	94	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	92
RoyalADN-E4	1	Bacteria no cultivada (EU133250)	Suelo de pradera	93	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	90
RoyalADN-H6	1	Bacteria no cultivada (EU132542)	Suelo de pradera	92	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	90
RoyalADN-T16	1	Bacteria no cultivada (EU132542)	Suelo de pradera	95	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	89
RoyalADN-H11	1	Bacteria no cultivada (EU132542)	Suelo de pradera	96	<i>Gaiella occulta</i> (JF423906)	84
RoyalADN-F2	1	<i>Aciditerrimonas</i> sp. no cultivado (JX505211)	Suelo	98	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	92
RoyalADN-T0	1	Bacteria no cultivada (EU133198)	Suelo de pradera	99	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	90
RoyalADN-F12	1	Bacteria no cultivada (DQ906836)	Subsuelo	94	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	87
RoyalADN-F1	1	Bacteria no cultivada (FJ592837)	Fumarola	94	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	91
RoyalADN-G9	1	Bacteria no cultivada (JN615946)	Biofilm en tubo de lava	94	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	85
RoyalADN-A9	1	Bacteria no cultivada (JN615946)	Biofilm en tubo de lava	93	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	84
RoyalADN-E1	1	Bacteria no cultivada (JN615946)	Biofilm en tubo de lava	95	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	85
RoyalADN-D11	1	Bacteria no cultivada (DQ906836)	Subsuelo	92	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	87
RoyalADN-D9	1	Bacteria no cultivada (JN592667)	Biofilm en tubo de lava	96	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (AB517669)	81
RoyalADN-E9	1	Bacteria no cultivada (JX222474)	Acuífero subterráneo	93	<i>Iamia majanohamensis</i> (AB360448)	86
RoyalADN-H3	1	Bacteria no cultivada (JX222474)	Acuífero subterráneo	91	<i>Iamia majanohamensis</i> (AB360448)	85
RoyalADN-G7	1	Bacteria no cultivada (DQ906836)	Subsuelo	92	<i>Ferrihrix thermotolerans</i> (AY140237)	84
RoyalADN-H12	1	Bacteria no cultivada (KC331763)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Pseudonocardia alaniniphila</i> (EU722519)	93
RoyalADN-T9	1	Actinobacteria no cultivada (FN297967)	Pared de tumba subterránea	97	<i>Pseudonocardia petroleophila</i> (X80596)	92
RoyalADN-T21	1	Bacteria no cultivada (HM445185)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Pseudonocardia petroleophila</i> (X80596)	95
RoyalADN-B4	1	Bacteria no cultivada (HM186652)	Sedimento subterráneo	93	<i>Streptomyces seranimatus</i> (DQ997046)	85
RoyalADN-T11	1	Bacteria no cultivada (KC331732)	Biofilm en tubo de lava	95	<i>Euzebya tangerina</i> (AB478418)	91
Gemmatimonadetes						
RoyalADN-B12	4	Bacteria no cultivada (HM445227)	Biofilm en tubo de lava	96	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	84

Capítulo 6

RoyalADN-D2	1	Bacteria no cultivada (JN672422)	Biofilm en tubo de lava	95	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	86
RoyalADN-F9	1	Bacteria no cultivada (HM186101)	Sedimento subterráneo	91	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	84
RoyalADN-H7	1	Bacteria no cultivada (JN701102)	Biofilm en tubo de lava	96	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	84
RoyalADN-H8	1	Bacteria no cultivada (JN592653)	Biofilm en tubo de lava	90	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	83
RoyalADN-T18	1	Gemmatimonadales no cultivado (AM935162)	Suelo contaminado	93	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	83
RoyalADN-C6	1	Bacteria no cultivada (JN672422)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i> (AP009153)	84
RoyalADN-A2	1	Bacteria no cultivada (JN701102)	Biofilm en tubo de lava	90	<i>Gemmatimonas phototrophica</i> (CP011454)	83
RoyalADN-F5	1	Bacteria no cultivada (JN701102)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Gemmatimonas phototrophica</i> (CP011454)	84
RoyalADN-G8	1	Bacteria no cultivada (JN701102)	Biofilm en tubo de lava	96	<i>Gemmatimonas phototrophica</i> (CP011454)	84
RoyalADN-G12	1	Bacteria no cultivada (HM445227)	Biofilm en tubo de lava	94	<i>Gemmatimonas phototrophica</i> (CP011454)	83
RoyalADN-D10	1	Bacteria no cultivada (HM445227)	Biofilm en tubo de lava	91	<i>Gemmatimonas phototrophica</i> (CP011454)	82
RoyalADN-T5	1	Bacteria no cultivada (HM445227)	Biofilm en tubo de lava	95	<i>Gemmatimonas phototrophica</i> (CP011454)	82
RoyalADN-T4	1	Bacteria no cultivada (HM445227)	Biofilm en tubo de lava	96	<i>Gemmatimonas phototrophica</i> (CP011454)	84
RoyalADN-B1	1	Gemmatimonadetes no cultivado (EF074353)	Pastos	90	<i>Gemmatimonas phototrophica</i> (CP011454)	80
Alphaproteobacteria						
RoyalADN-E12	1	Bacteria no cultivada (JF265953)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Methylocapsa aurea</i> (JQKO01000009)	97
RoyalADN-D8	1	Bacteria no cultivada (JN616053)	Biofilm en tubo de lava	97	<i>Methylocapsa aurea</i> (JQKO01000009)	96
RoyalADN-C2	1	Bacteria no cultivada (JN801129)	Biofilm en tubo de lava	93	<i>Methylocapsa aurea</i> (JQKO01000009)	93
RoyalADN-C7	1	Bacteria no cultivada (JN801129)	Biofilm en tubo de lava	95	<i>Methylocapsa aurea</i> (JQKO01000009)	95
RoyalADN-T10	1	Bacteria no cultivada (JN616053)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Methylocapsa aurea</i> (JQKO01000009)	97
RoyalADN-G2	1	<i>Ralstonia pickettii</i> (JN644070)	Biofilm en un río	95	<i>Ensifer adhaerens</i> (JNAE01000171)	96
RoyalADN-D3	1	<i>Hyphomicrobium</i> sp. no cultivado (JN541177)	Lodo activado en una depuradora	97	<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i> (KB911255)	97
RoyalADN-B2	1	Alphaproteobacteria no cultivada (GU205295)	Sedimento, Cueva Roraima Sur	98	<i>Beijerinckia dextrii</i> subsp. <i>venezuelae</i> (AJ563934)	97
RoyalADN-T1	1	Bacteria no cultivada (HQ114100)	Biofilms de un filtro	95	<i>Sphingobium ummariense</i> (AUWY01000048)	93
RoyalADN-T28	1	Caulobacterales no cultivado (HM798816)	Agua oceánica	99	<i>Phenylobacterium haematophilum</i> (AJ244650)	98
RoyalADN-T2	1	Caulobacterales no cultivado (HM798816)	Agua oceánica	98	<i>Phenylobacterium haematophilum</i> (AJ244650)	97
RoyalADN-T14	1	Bacteria no cultivada (GQ263108)	Almacén de residuos	99	<i>Methyloceanibacter caenitepidi</i> (AB794104)	96

RoyalADN-T20	1	Bacteria no cultivada (HM445320)	Biofilm en tubo de lava	98	<i>Filomicrobium fusiforme</i> (Y14313)	94
Firmicutes						
RoyalADN-G4	2	Bacteria no cultivada (AM777947)	Agua subterránea	98	<i>Caldanaerovirga acetigignens</i> (EF530069)	85
RoyalADN-F7	1	Bacteria no cultivada (DQ088769)	Agua subterránea, mina	95	<i>Dethiobacter alkaliphilus</i> (ACJM01000032)	90
RoyalADN-F3	1	<i>Paenibacillus</i> sp. (KC815539)	Suelo rico en selenio	95	<i>Paenibacillus selenitireducens</i> (KC815539)	95
RoyalADN-G6	1	Bacteria no cultivada (HM186142)	Sedimento subterráneo	92	<i>Thermaerobacter nagasakiensis</i> (AB061441)	80
RoyalADN-G10	1	Bacteria no cultivada (HM186978)	Sedimento subterráneo	95	<i>Ammonifex thiophilus</i> (EF554597)	82
RoyalADN-E2	1	Bacteria no cultivada (HM186142)	Sedimento subterráneo	96	<i>Calditerricola satsumensis</i> (AB250968)	82
RoyalADN-T3	1	Bacteria no cultivada (HM186142)	Sedimento subterráneo	97	<i>Calditerricola satsumensis</i> (AB250968)	82
RoyalADN-T17	1	Bacteria no cultivada (HM186142)	Sedimento subterráneo	95	<i>Calditerricola satsumensis</i> (AB250968)	82
RoyalADN-T26	1	<i>Ammoniphilus</i> sp. (KC771249)	Desierto	99	<i>Ammoniphilus oxalaticus</i> (Y14578)	96
Acidobacteria						
RoyalADN-G5	1	Bacteria no cultivada (EU589262)	Suelo de arrozal	95	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	80
RoyalADN-D5	1	Bacteria no cultivada (HE576378)	Fluido de metalurgia	99	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	84
RoyalADN-T7	1	Bacteria no cultivada (EU589262)	Suelo de arrozal	98	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	81
RoyalADN-T15	1	Bacteria no cultivada (EU589262)	Suelo de arrozal	98	Candidatus <i>Koribacter versatilis</i> (CP000360)	81
RoyalADN-A10	1	Acidobacteria no cultivada (JN178895)	Cavernas Kartchner	93	<i>Acidobacterium capsulatum</i> (CP001472)	81
RoyalADN-C3	1	Bacteria no cultivada (HE576378)	Fluido de metalurgia	98	<i>Granulicella pectinivorans</i> (AM887757)	82
Deltaproteobacteria						
RoyalADN-A6	1	Bacteria no cultivada (HM444845)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Desulfacinum infernum</i> (L27426)	87
RoyalADN-B6	1	Bacteria no cultivada (HM445394)	Biofilm en tubo de lava	93	<i>Desulfovibrio longreachensis</i> (Z24450)	80
RoyalADN-B8	1	Deltaproteobacteria no cultivada (KJ192026)	Suelo bajo pino	96	<i>Desulfuromonas palmitatis</i> (U28172)	84
RoyalADN-C11	1	Bacteria no cultivada (EU134536)	Suelo de pradera	93	<i>Sorangium cellulosum</i> (EU240497)	84
Gammaproteobacteria						
RoyalADN-G1	1	Bacteria no cultivada (JN615964)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Thioalkalivibrio denitrificans</i> (AF126545)	91
RoyalADN-T12	1	Bacteria no cultivada (EU786122)	Rizosfera del algodón	99	<i>Povalibacter uvarum</i> (AB548216)	88
RoyalADN-G11	1	<i>Steroidobacter</i> sp. no cultivado (FN297970)	Pared de tumba subterránea	95	<i>Povalibacter uvarum</i> (AB548216)	96
Chloroflexi						
RoyalADN-B11	1	Chloroflexi no cultivado (JF706690)	Suelo de desierto	80	<i>Caldilinea tarbellica</i> (HM134893)	81
RoyalADN-T25	1	Bacteria no cultivada (JX221933)	Acuífero subterráneo	94	<i>Thermoflexus hugenholtzii</i> (KC526151)	81

Capítulo 6

Betaproteobacteria						
RoyalADN-F11	1	<i>Ralstonia pickettii</i> (HQ696445)	<i>Populus euphratica</i>	95	<i>Ralstonia pickettii</i> (AY741342)	97
Planctomycetes						
RoyalADN-E10	1	Bacteria no cultivada (EU135041)	Suelo de pradera	94	<i>Thermogutta hipogea</i> (KC867695)	83
Nitrospirae						
RoyalADN-E7	1	Bacteria no cultivada (JN607027)	Biofilm en tubo de lava	93	Candidatus <i>Nitrospira bockiana</i> (EU084879)	90
Thermodesulfobacteria						
RoyalADN-H1	1	Bacteria no cultivada (JN672538)	Biofilm en tubo de lava	99	<i>Thermosulfurimonas dismutans</i> (JF346116)	83
Bacterias sin clasificar*						
RoyalADN-F8	1	Bacteria no cultivada (JN592669)	Biofilm en tubo de lava	92	-	-
RoyalADN-E8	1	Bacteria no cultivada (HM186142)	Sedimento subterráneo	87	-	-
RoyalADN-H10	1	Bacteria no cultivada (HM445333)	Biofilm en tubo de lava	94	-	-
RoyalADN-B5	1	Bacteria no cultivada (EU589262)	Suelo de arrozal	90	-	-
RoyalADN-B7	1	Bacteria no cultivada (EU589262)	Suelo de arrozal	92	-	-
RoyalADN-D4	1	Chloroflexi no cultivado (HE603181)	Biofilm, pared de cueva	88	-	-
RoyalADN-D6	1	Bacteria no cultivada (HE576378)	Fluidos de metalurgia	91	-	-
RoyalADN-T8	1	Bacteria no cultivada (EU589262)	Suelo de arrozal	91	-	-
RoyalADN-T13	1	Bacteria no cultivada (AY988636)	Suelo	93	-	-
RoyalADN-T24	1	Gemmatimonadales no cultivado (AM935162)	Suelo contaminado	95	-	-
RoyalADN-T27	1	Bacteria no cultivada (JN615946)	Biofilm en tubo de lava	88	-	-
RoyalADN-T30	1	Bacteria no cultivada (HM186142)	Sedimento subterráneo	90	-	-

*No fue posible clasificar los OTUs con un porcentaje de similitud menor del 80% (EZtaxon), por lo que no se especifica la especie cultivada más cercana.

En el análisis matemático de la distribución de las secuencias de los clones de las muestras de las Islas Galápagos, las curvas de rarefacción generadas tuvieron un perfil muy similar. Las curvas a nivel de especie (97% de similitud) y de género (95% de similitud), se mantuvieron en fase exponencial en ambas muestras, siendo únicamente las obtenidas a nivel de filo (80% de similitud) las que ya comenzaban a mostrar tendencia a la saturación (Figura 6.6).

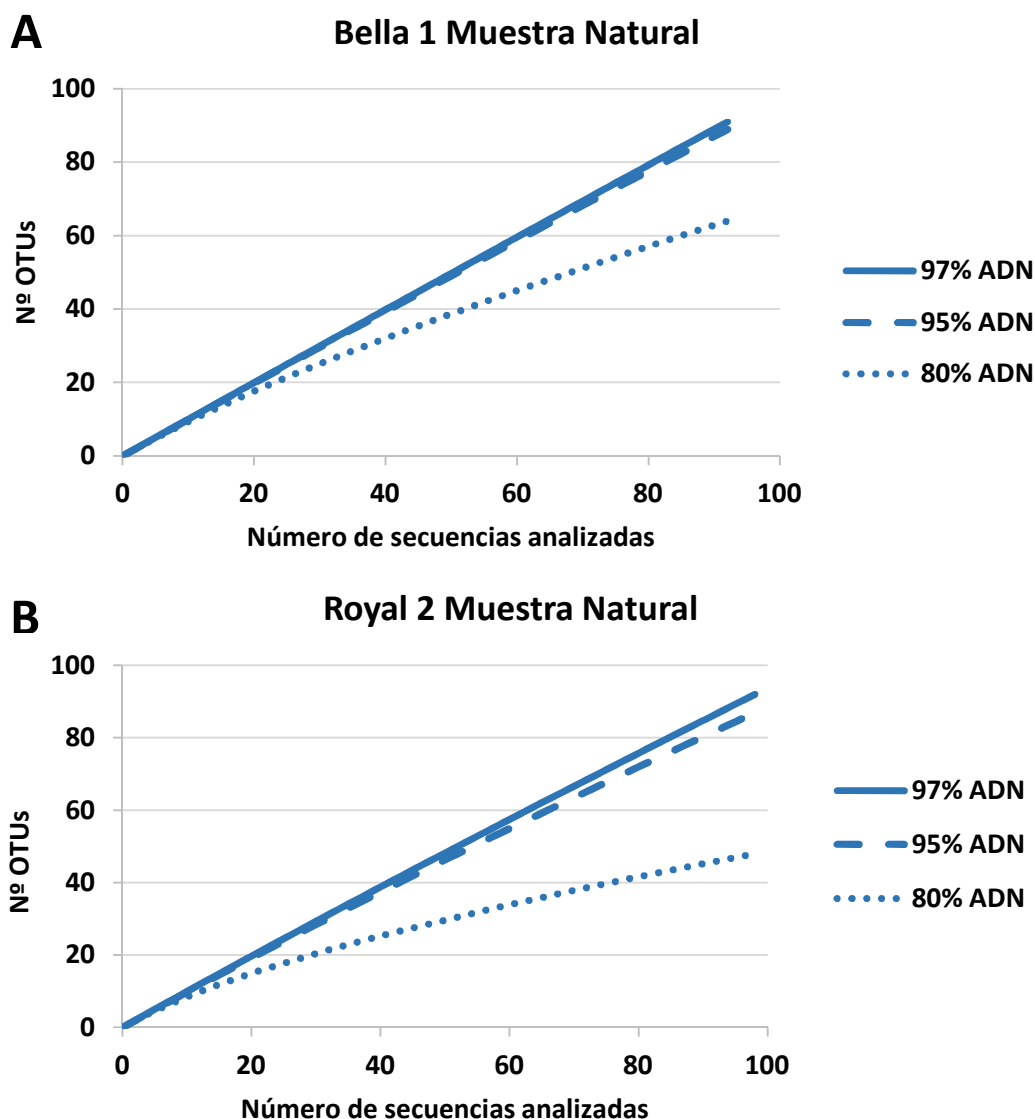


Figura 6.6 Curvas de rarefacción de las muestras naturales de los tubos de lava de la Isla Santa Cruz. A. Muestra Bella 1. B. Muestra Royal 2. Se representa el número de secuencias analizadas frente al número de OTUs generados a tres niveles de similitud: especie (97%), género (95%) y filo (80%). Genoteca de ADN (—).

Estos resultados confirmaron que las muestras Bella 1 y Royal 2 poseían una amplia diversidad de comunidades bacterianas, como se corroboró con los datos de las genotecas elaboradas.

6.3.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Las observaciones al microscopio electrónico de barrido de la muestra de moonmilk Bella 1 revelaron la estructura característica de la calcita, poniendo de manifiesto las fibras individuales con forma de aguja (Figura 6.7 A y B). También se pudieron detectar EPS y bacterias asociadas al entramado conformado por las fibras de calcita (Figura 6.7 C y D).

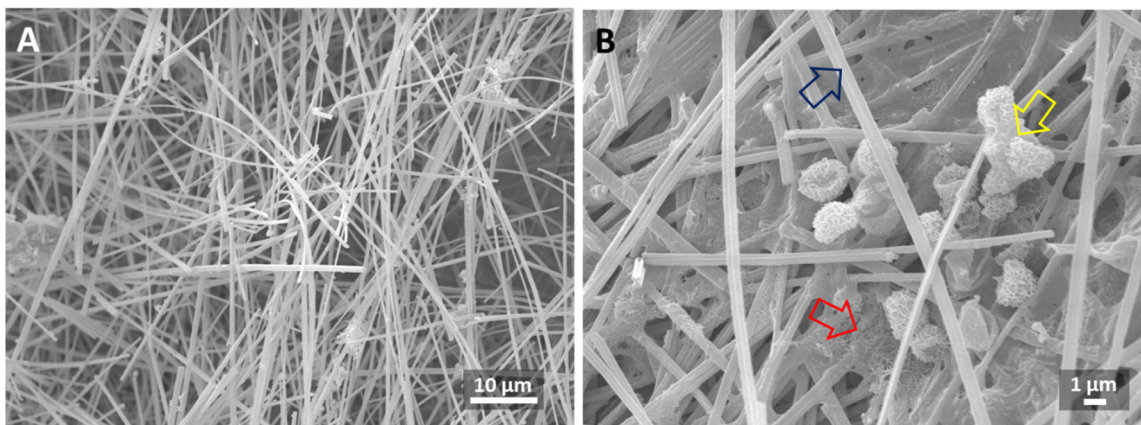


Figura 6.7 Imágenes FESEM de la muestra Bella 1. A. Fibras de calcita con forma de aguja (“needle fibre calcite”, NFC). B. Detección de EPS (flecha roja) y bacterias (flecha amarilla) en el entramado de las NFC de la calcita (flecha azul).

En cuanto a la muestra de coralloides Royal 2, mediante FESEM fue posible la observación de EPS asociadas a depósitos minerales (Figura 6.8).

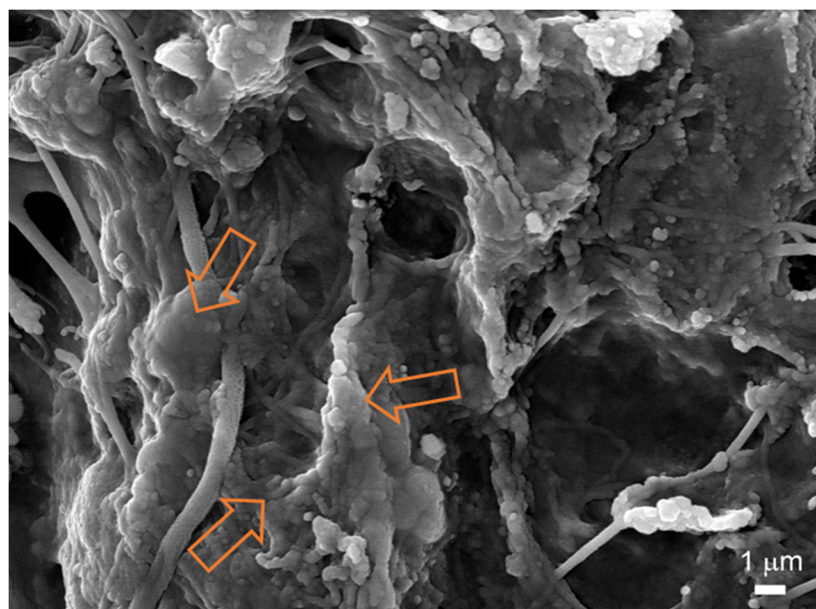


Figura 6.8 Imagen tomada mediante FESEM de la muestra de coralloides Royal 2. Las flechas indican los depósitos minerales asociados a las sustancias poliméricas extracelulares.

6.4 DISCUSIÓN

Las muestras de las Islas Galápagos exhibieron características propias de aquellas que provienen de entornos volcánicos: la posesión de un elevado número de clones en las genotecas con similitud menor del 95% con secuencias conocidas y una predominancia de OTUs de tipo “singleton” (Riquelme y col., 2015). Estos hechos resultaron especialmente predominantes en el caso de la muestra Bella 1, debido a que prácticamente tres cuartas partes de los clones obtenidos poseyeron valores de similitud menores del 80%. De esta manera, los tubos de lava analizados volvieron a manifestar un gran potencial como fuente de aislamiento de nuevas especies microbianas, semejante al de los tubos de lava de las Islas Canarias (Capítulo 5).

A causa de que la mayor parte de los filotipos detectados presentaron unos valores de similitud menores del 90% con respecto a especies microbianas cultivadas, dichas similitudes filogenéticas resultaron inciertas y, por tanto, no fue posible la asignación de capacidades funcionales basadas en este aspecto. Dicha problemática se ha presentado con anterioridad tanto en estudios microbiológicos en tubos de lava (Hathaway, 2010; Garcia y col., 2009) así como en diversas cavidades subterráneas, como por ejemplo en cuevas en acantilados rocosos (Cockell y col., 2011) y en tumbas etruscas (Díaz-Herrera y col., 2014).

Al igual que con las muestras analizadas de los tubos de lava de las Islas Canarias (Capítulo 5), en el análisis de los espeleotemas de las Islas Galápagos existieron dificultades para la extracción de ácidos nucleicos. Todo ello está en consonancia de nuevo con las afirmaciones por parte de Herrera y Cockell (2007), que incidieron en que la diversidad y complejidad de las muestras de los ambientes volcánicos resulta un hándicap a la hora de realizar análisis moleculares, como ya se discutió en el apartado 5.4.1 de esta tesis.

Es preciso resaltar también que en los estudios de diversidad bacteriana basados en técnicas convencionales de biología molecular, especialmente en aquellos realizados en terrenos volcánicos y tubos de lava, es común que las curvas de rarefacción muestren que no se ha abarcado el estudio de todas las comunidades existentes en las muestras, de manera que llevar a cabo una cobertura más profunda suele estar fuera del alcance de dichos estudios (García y col., 2009; Hathaway y col., 2014a; Bent y Forney, 2008; Kelly y col., 2010).

En cuanto a los datos obtenidos en las genotecas, el filo Gemmatimonadetes fue detectado en las dos muestras de las Islas Galápagos con un porcentaje de distribución similar. Este filo comprende aproximadamente el 2% de las comunidades bacterianas del suelo (DeBruyn y col., 2011), con una distribución amplia en el medio ambiente y una mayor diversidad genética de la que se pensó inicialmente (Zeng y col.,

2016). También se identificó en los tubos de lava de Hawái estudiados por Garcia y col. (2009) y en los tubos de lava de las Islas Canarias (Capítulo 5).

El filo Actinobacteria poseyó mayor abundancia en Royal 2, ya que en Bella 1 gran parte de las teóricas actinobacterias poseyeron porcentajes de similitud bajos y por tanto se consideraron bacterias sin clasificar. Fue el filo predominante en la muestra de coraloides, situación coincidente con los datos de otros tubos de lava anteriormente estudiados (Garcia y col., 2009; Riquelme y col., 2015).

En ambas muestras se pudieron detectar los filos Acidobacteria, Firmicutes y Proteobacteria, aunque abarcaron mayores porcentajes de representación en Royal 2. Los filos minoritarios Chloroflexi, Planctomycetes, Nitrospirae, Bacteroidetes y Thermodesulfobacteria también se detectaron en las muestras de Galápagos, aunque las secuencias analizadas presentaron porcentajes de similitud inferiores al 90% con los homólogos más cercanos. Northup y col. (2008), Garcia y col. (2009), Moya y col. (2009) y Gómez-Álvarez y col. (2007) identificaron dichos filos en tubos de lava de Hawái, Nuevo México y otros terrenos volcánicos.

Por otra parte, aunque gran parte de las secuencias en la genoteca de Bella 1 mostraron similitud con bacterias de ambientes no volcánicos, en la muestra de coraloides Royal 2 los biofilms presentes en tubos de lava sí representaron la procedencia más frecuente de las identificaciones bacterianas del NCBI. Uno de los aspectos más llamativos de los resultados obtenidos en el estudio de las muestras de espeleotemas de las Islas Galápagos fue precisamente que muchas de las bacterias no cultivadas detectadas procedieron de entornos volcánicos similares a los tubos de lava.

En la muestra Royal 2 los filotipos bacterianos asociados a *Aciditerrimonas* abarcaron más del 10% de todas las secuencias, con un 98% de similitud máxima. Dentro de este género se encuentra la especie *Aciditerrimonas ferrireducens*, actinobacteria quimiolitautótrofa termoacidófila reductora de hierro, procedente de un suelo con emanaciones volcánicas solfatáricas (Itoh y col., 2011).

En la genoteca de Royal 2, se identificó un filotipo relacionado con *Methyloceanibacter*, con un 96% de similitud. Dicho género, perteneciente al filo Proteobacteria, engloba a bacterias termófilas procedentes de sedimentos de fuentes hidrotermales (Takeuchi y col., 2014). En la muestra Bella 1 también se identificó este filotipo, pero con un porcentaje de similitud de únicamente el 88%.

Hay que resaltar que, en Royal 2, la especie más representada de Alphaproteobacteria correspondió a *Methylocapsa aurea* (con un 97% de similitud máxima), especie que junto a *Beijerinckia* sp. e *Hyphomicrobium* sp. (también con el 97% de similitud) conforman un trío de bacterias que se hallaron en las muestras de depósitos negros de la Mina das Aveleiras (Capítulo 4). *Hyphomicrobium* es conocido por su capacidad de oxidar el hierro y el manganeso (Moore, 1981) y ha figurado como

género recurrente en las muestras analizadas en esta tesis, tanto en las minas de agua como en los tubos de lava.

La clase Betaproteobacteria incluyó solamente dos secuencias del total, una en la muestra de moonmilk y otra en la de coraloides. En la genoteca de Bella 1, el filotipo correspondiente presentó un 96% de similitud con *Advenella kashmirensis*, una especie quimiolitohalófila facultativa oxidante de azufre (Ghosh y col., 2011), la cual también se encontró en suelos contaminados (Sopeña y col., 2014) y en las muestras de mucolitos del tubo de lava de la Cueva del Llano de los Caños de esta tesis (Capítulo 5).

Además, en la muestra de coraloides fue posible obtener filotipos relacionados con el género *Ammoniphilus* (99% de similitud), perteneciente a Firmicutes, el cual contiene la especie halotolerante y alcalitolerante *Ammoniphilus oxalaticus*, con la capacidad de degradar los oxalatos (Zaitsev y col., 1998).

También se reveló la existencia de un bajo número de OTUs compartidos entre los tubos de lava de las Islas Galápagos y los de las Islas Canarias. Hathaway y col. (2014a) ya anticiparon que era posible que la localización geográfica y la composición química concreta de la lava subyacente tuviera alguna clase de influencia en las comunidades microbianas resultantes, puesto que encontraron sólo un 5% de OTUs bacterianos compartidos entre los tubos de lava de Hawái y las Azores.

Los datos obtenidos por microscopía electrónica de barrido de la muestra de moonmilk, corroboraron la naturaleza típica de este espeleotema, mediante la observación de las fibras de calcita embebidas en EPS en Bella 1. Este hecho, junto a la asociación con bacterias, hace pensar en el posible origen biogénico del espeleotema, de manera similar a la situación acontecida en el moonmilk del túnel de Paranhos (Capítulo 3). A su vez, en la muestra Royal 2 también se observaron depósitos minerales asociados a una cantidad considerable de EPS, por lo que los microorganismos también pueden haber influenciado el proceso de formación de los coraloides.

La posible presencia de especies quimiolitohalófilas en los tubos de lava de las Islas Galápagos convierte a estos entornos volcánicos en ambientes subterráneos de interés para la Astrobiología, teniendo en cuenta que en Marte se han descrito actividades volcánicas y tubos de lava (Greely y Spudis, 1981) y que la forma de vida quimiolitohalófila puede ser la única alternativa aceptable para la vida en este planeta (Jakosky y Shock, 1998). De hecho, entre las estrategias de investigación que la NASA desarrolla actualmente se encuentra el estudio de ecosistemas quimiolitohalófilos (He y col., 2016).

El presente estudio también resalta la necesidad de realizar una exploración en mayor profundidad de estos tubos de lava, al tratarse de ambientes con gran potencial como fuente de aislamiento de nuevas especies microbianas.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

Los resultados del trabajo desarrollado permiten establecer las siguientes conclusiones:

- 1) El estudio geomicrobiológico multidisciplinar desarrollado en esta Tesis Doctoral apoya la existencia de depósitos de minerales secundarios biogénicos en los ambientes de estudio del túnel de Paranhos (Oporto, Portugal), la Mina das Aveleiras (Braga, Portugal), los tubos de lava de La Palma y Gran Canaria (Islas Canarias, España) y los tubos de lava de las Islas Galápagos (Ecuador):
 - El análisis microscópico de la mayor parte de los espeleotemas estudiados reveló la presencia de bacterias y sustancias poliméricas extracelulares asociadas a los depósitos minerales, lo que aportó indicios de la existencia de procesos de biomineralización por parte de los microorganismos.
 - La identificación de bacterias oxidantes de manganeso y hierro en los depósitos negros del túnel de Paranhos, de la Mina das Aveleiras y de los tubos de lava de La Palma y Gran Canaria, detectadas en las respectivas genotecas, sugiere que estas bacterias pueden ser responsables de la oxidación y precipitación de estos componentes mediante procesos de biomineralización.
 - Los depósitos de moonmilk del túnel de Paranhos y de la Cueva de Bellavista (Islas Galápagos, Ecuador) están formados por fibras de calcita de posible origen biogénico, ya que se encuentran asociadas a comunidades microbianas probablemente implicadas en la precipitación de los carbonatos.
- 2) Se ha comprobado la existencia de filamentos reticulados en las muestras analizadas y su origen biológico, asociados a depósitos minerales y sustancias poliméricas extracelulares. Las vainas minerales de estos filamentos muestran la implicación de estos microorganismos, de origen desconocido, en procesos de biomineralización.
- 3) Gran parte de la comunidad microbiana de los depósitos negros de ferromanganeso del túnel de Paranhos (Oporto, Portugal) está relacionada con las fuentes de contaminación urbana superficiales, que llegan al túnel mediante las aguas de infiltración, hecho que quedó patente tanto en los aislamientos obtenidos como en las genotecas elaboradas.
- 4) Las técnicas de biología molecular fueron fundamentales para lograr un conocimiento más profundo de las comunidades microbianas existentes en las minas de agua y los tubos de lava objeto de estudio, especialmente útiles en lo que respecta a estos últimos, ya que las muestras de dichos ambientes volcánicos se suelen caracterizar por poseer escasa biomasa y aspectos

intrínsecos tanto físicos como químicos que elevan la complejidad de su estudio.

- 5) Los tubos de lava de las Islas Canarias y de las Islas Galápagos son ambientes con un gran potencial como fuentes de aislamiento de nuevas especies microbianas, como se desprende de la baja similitud de los clones obtenidos respecto a bacterias cultivadas e identificadas.
- 6) En el estudio de la Cueva del Llano de los Caños (La Palma, Islas Canarias, España) ha quedado reflejado el aporte considerable de materia orgánica proveniente de la vegetación sobre la cavidad, que percola a través de fracturas en la roca, la cual puede constituir una valiosa fuente de energía para los microorganismos e incluso contribuir a la formación de espeleotemas. De esta forma, los microorganismos del suelo y las raíces pueden ser capaces de migrar de sus entornos originales y afectar a las comunidades microbianas de los tubos de lava.
- 7) Los datos obtenidos en las genotecas pusieron de manifiesto la existencia de distintas comunidades bacterianas entre los tubos de lava de las Islas Galápagos y los de las Islas Canarias, por lo que la localización geográfica y la naturaleza del sustrato pueden ser importantes para determinar la composición específica de las comunidades microbianas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, W.R., Strömpl, C., Meyer, H., Lindholm, S., Moore, E.R., Christ, R., Vancanneyt, M., Tindall, B.J., Bennasar, A., Smit, J., Tesar, M. 1999. Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. International Journal of Systematic Bacteriology 49: 1053-1073.
- Afonso, M.J. 2003. Hidrogeologia de rochas graníticas da região do Porto (NW de Portugal). Cadernos Laboratório Xeolóxico de Laxe, Coruña 28: 173-192.
- Afonso, M.J., Chaminé, H.I., Carvalho, J.M., Marques, J.M., Carreira, P.M., Guimarães, L., Guilhermino, L., Fonseca, P.E., Gomes, A., Fonseca, M., Pires, A., Rocha, F.T. 2007a. Uma abordagem geoambiental no estudo dos subterrâneos da cidade do Porto: o caso do manancial de Paranhos. En: Seminário sobre Águas Subterrâneas, LNEC, 1-2 de Março de 2007. Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos, APRH, Lisboa, pp. 1-10.
- Afonso, M.J., Marques, J.M., Guimarães, L., Costa, I., Teixeira, J., Seabra, C., Rocha, F., Guilhermino, L., Chaminé, H.I. 2007b. Urban hydrogeological mapping of the Porto área (NW Portugal): a geoenvironmental perspective. En: Chery, L., de Marsilly, G.H. (Eds.). Aquifer Systems Management: Darcy's Legacy in a World of Impending Water Shortage. Taylor & Francis, Leiden, pp. 389-404.
- Afonso, M.J., Pires, A., Helder, H.I., Marques, J.M., Guimarães, L., Guilhermino, L., Rocha, F. 2010a. Aquifer vulnerability assessment of urban áreas using a GIS-based cartography: Paranhos groundwater pilot site, Porto, NW Portugal. En: Paliwal, B.S. (Ed.). Selected Papers from the 33rd International Geological Congress, General Symposium: Hydrogeology, Oslo (Noruega), 6 – 14 agosto 2008, Scientific Publishers, Jodhpur, India, pp. 259-278.
- Afonso, M.J., Chaminé, H.I., Marques, J.M., Carreira, P.M., Guimarães, L., Guilhermino, L., Gomes, A., Fonseca, P.E., Pires, A., Rocha, F. 2010b. Environmental issues in urban groundwater systems: a multidisciplinary of the Paranhos and Salgueiros spring waters, Porto (NW Portugal). Environmental Earth Sciences 61: 379-392.
- Altmann, H.J. 1972. Bestimmung von in Wasser gelöstem Sauerstoff mit Leukoberbelinblau I. Eine schnelle Winklermethode. Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie 262: 97-99.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215: 403-410.

Bibliografia

- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59: 143-169.
- Amorim, A.A., Pinto, J.N. 2001. Porto d'Agoa. Serviços Municipalizados de Águas e Saneamento do Porto. 197 pp.
- Anderson, C.R., James, R.E., Fru, E.C., Kennedy, C.B., Pedersen, K. 2006. In situ ecological development of a bacteriogenic iron oxide-producing microbial community from a subsurface granitic rock environment. *Geobiology* 4: 29-42.
- Anderson, C., Jakobsson, A.-M., Pedersen, K. 2007. Influence of in situ biofilm coverage on the radionuclide adsorption capacity of subsurface granite. *Environmental Science and Technology* 41: 830-836.
- Atlas, R.M., Bartha, R. 1993. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*, third ed. Benjamin/Cummings, Menlo Park, California, EE.UU.
- Aubrecht, R., Brewer-Carías, Ch., Smída, B., Audy, M., Kovácik, L. 2008. Anatomy of biologically mediated opal speleothems in the World's largest sandstone cave: Cueva Charles Brewer, Chimantá Plateau, Venezuela. *Sedimentary Geology* 203: 181-195.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.). 1992. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates/ Wiley Interscience, Nueva York.
- Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55: 541-555.
- Bakewell, R. 1833. *An Introduction to Geology: Intended to Convey a Practical Knowledge of the science, and comprising the most important recent discoveries; with explanations of the facts and phenomena which serve to confirm or invalidate various geological theories*. Hezekiah Howe & Co, New Haven.
- Banks, E.D., Taylor, N.M., Gulley, J., Lubbers, B.R., Giarrizzo, J.G., Bullen, H.A., Hoehler, T.M., Barton, H.A. 2010. Bacterial calcium carbonate precipitation in cave environments: A function of calcium homeostasis. *Geomicrobiology Journal* 27: 444-454.
- Banwart, S. 1995. The Aspo redox investigations in block scale. Project summary and implications for repository performance assessment. SKB Technical Report 95-26. Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co., Stockholm.

- Bargar, J.R., Tebo, B.M., Bergmann, U., Webb, S.M., Glatzel, P., Chiu, V.Q., Villalobos, M. 2005. Biotic and abiotic products of Mn(II) oxidation by spores of the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. *American Mineralogist* 90: 143-154.
- Barnes-Svarney, P., Svarney, T.E. 2004. *The Handy Geology Answer Book*. Visible Ink Press, Detroit.
- Barton, H.A., Jurado, V. 2007. What's up down there? Microbial diversity in caves. *Microbe* 2: 132-138.
- Barton, H.A., Northup, D.E. 2007. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies* 69: 163-178.
- Barton, H.A., Taylor, N.M., Lubbers, B.R., Pemberton, A.C. 2006. DNA extraction from low-biomass carbonate rock: an improved method with reduced contamination and the low-biomass contaminant database. *Journal of Microbiological Methods* 66: 21–31.
- Barton, H.A., Taylor, N.T., Krete, M.P., Springer, A.C., Oehrle, S.A., Bertog, J.L. 2007. The impact of host rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments. *International Journal of Speleology* 36: 93-104.
- Basciano, L.C., Peterson, R.C. 2007. Jarosite-hydronium jarosite solid-solution series with full iron site occupancy: mineralogy and crystal chemistry. *American Mineralogist* 92: 1464-1473.
- Baskar, S., Baskar, R., Mauclaire, L., McKenzie, J.A. 2006. Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: possible origin for stalactites in Sahastradhara caves, Dehradun, India. *Current Science* 90: 58-64.
- Baskar, S., Baskar, R., Routh, J. 2011. Biogenic evidences of moonmilk deposition in the Mawmluh Cave, Meghalaya, India. *Geomicrobiology Journal* 28: 252-265.
- Bäuerlein, E. 2004. *Biomineralization: Progress in Biology, Molecular Biology and Application*. Wiley-VHC Verlag, Weinheim.
- Bazylinski, D.A., Frankel, R.B. 2003. Biologically controlled mineralization in prokaryotes. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 54: 95-114.
- Bent, S.J., Forney, L.J. 2008. The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *The ISME Journal* 2: 689-695.
- Benzerara, K., Miot, J., Morin, G., Ona-Nguema, G., Skouri-Panet, F., Ferard, C. 2011. Significance, mechanisms and environmental implications of microbial biomineralization. *Comptes Rendus Geoscience* 343: 160-167.

Bibliografia

- Bernard, P., Couturier, M. 1992. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology* 226: 735-745.
- Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E.M., Couturier, M. 1994. Positive selection vectors using F plasmid ccdB killer gene. *Gene* 148: 71-74.
- Bindschedler, S., Millière, L., Cailleau, G., Job, D., Verrecchia, E.P. 2010. Calcitic nanofibres in soils and caves: a putative fungal contribution to carbonatogenesis. *Geological Society, Londres, Special Publications*, 336: 225-238.
- Bindschedler, S., Millière, L., Cailleau, G., Job, D., Verrecchia, E.P. 2012. An ultrastructural approach to analogies between fungal structures and needle fiber calcite. *Geomicrobiology Journal* 29: 301-313.
- Blyth, A.J., Frisia, S. 2008. Molecular evidence for bacterial mediation of calcite formation in cold high-altitude caves. *Geomicrobiology Journal* 25: 101-111.
- Bögli, A. 1980. *Karst Hydrology and Physical Speleology*. Springer-Verlag, Nueva York.
- Bond, P.L., Hugenholtz, P., Keller, J., Blackall, L.L. 1995. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1910-1916.
- Boonfueng, T., Axe, L., Yee, N., Hahn, D., Ndiba, P.K. 2009. Zn sorption mechanisms onto sheathed *Leptothrix discophora* and the impact of the nanoparticulate biogenic Mn oxide coating. *Journal of Colloid and Interface Science* 333: 439-447.
- Borneman, J., Triplett, E.W. 1997. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2647-2653.
- Borowitzka, M.A. 1982. Mechanisms in algal calcification. *Progress in Phycological Research* 1: 137-178.
- Boston, P.J., Ivanov, M.V., McKay, C.P. 1992. On the possibility of chemosynthetic ecosystems in subsurface habitats on Mars. *Icarus* 95: 300-308.
- Brilha, J. 2009. Geological heritage and geoconservation in Portugal. En: de Carvalho, C.N., Rodrigues, J. (Eds.). *New Challenges with Geotourism. Proceedings of the VIII European Geoparks Conference*. 4-6 September 2009, Idanha-a-Nova, Portugal, pp. 31-35.

- Brocx, M., Semeniuk, V. 2007. Geoheritage and geoconservation – history, definition, scope and scale. *Journal of the Royal Society of Western Australia* 90: 53-87.
- Broughton, P.L. 1971. Origin and distribution of mineral species in limestone caves. *Earth Science Journal* 5: 36-43.
- Brown, S.D., Podar, M., Klingeman, D.M., Johnson, C.M., Yang, Z.K., Utturkar, S.M., Land, M.L., Mosher, J.J., Hurt, R.A. Jr, Phelps, T.J., Palumbo, A.V., Arkin, A.P., Hazen, T.C., Elias, D.A. 2012. Draft genome sequences for two metal-reducing *Pelosinus fermentans* strains isolated from a Cr(VI)-contaminated site and for type strain R7. *Journal of Bacteriology* 194: 5147-5148.
- Bruun, A.M., Finster, K., Gunnlaugsson, H.P., Nornberg, P., Friedrich, M.W. 2010. A comprehensive investigation on iron cycling in a freshwater seep including microscopy, cultivation and molecular community analysis. *Geomicrobiology Journal* 27: 15-34.
- Bull, P.A. 1983. Chemical sedimentation in caves. En: Goudie, A.S., Pye, K. (Eds.). *Chemical Sediments and Geomorphology: Precipitates and Residua in the Near-surface Environment*. Academic Press, Londres, pp. 301-319.
- Cacchio, P., Ferrini, G., Ercole, C., Del Gallo, M., Lepidi, A. 2014. Biogenicity and characterization of moonmilk in the Grotta Nera (Majella National Park, Abruzzi, central Italy). *Journal of Cave and Karst Studies* 76: 88-103.
- Cailleau, G., Verrecchia, E.P., Braissant, O., Emmanuel, L. 2009. The biogenic origin of needle fibre calcite. *Sedimentology* 56: 1858-1875.
- Calaforra, J.M., Forti, P., Fernandez-Cortes, A. 2008. The speleothems in gypsum caves and their paleoclimatological significance. *Environmental Geology* 53: 1099-1105.
- Cañaveras, J.C., Hoyos, M., Sánchez-Moral, S., Sanz-Rubio, E., Bedoya, J., Soler, V., Groth, I., Schumann, P. 1999. Microbial communities associated with hydromagnesite and needle-fiber aragonite deposits in a Karstic Cave (Altamira, Northern Spain). *Geomicrobiology Journal* 16: 9-25.
- Cañaveras, J.C., Sanchez-Moral, S., Soler, V., Saiz-Jimenez, C. 2001. Microorganisms and microbially induced fabrics in cave walls. *Geomicrobiology Journal* 18: 223-240.
- Cañaveras, J.C., Cuezva, S., Sanchez-Moral, S., Lario, J., Laiz, L., Gonzalez, J.M., Saiz-Jimenez, C. 2006. On the origin of fiber calcite crystals in moonmilk deposits. *Naturwissenschaften* 93: 27-32.

- Cao, Y., Chen, F., Li, Y., Wei, S., Wang, G. 2015. *Paenibacillus ferrarius* sp. nov., isolated from iron mineral soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 165-170.
- Carmichael, M.J., Carmichael, S.K., Santelli, C.M., Strom, A., Bräuer, S.L. 2013. Mn(II)-oxidizing bacteria are abundant and environmentally relevant members of ferromanganese deposits in caves of the upper Tennessee River basin. *Geomicrobiology Journal* 30: 779-800.
- Carretero León, M.I., Pozo Rodríguez, M. 2007. *Mineralogía Aplicada: Salud y Medio Ambiente*. Ediciones Paraninfo, S.A, Madrid.
- Castanier, S., Le Métayer-Levrel, G., Perthuisot, J.P. 2000. Bacterial roles in the precipitation of carbonate minerals. En: Riding, R.E., Awramik, S.M. (Eds.). *Microbial Sediments*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 32-39.
- Castaño de Luis, R., Redondo Vega, J.M., Fernández Martínez, E. 2010. La cueva de Valdelajo (Sahelices de Sabero, León): una pequeña joya geológica en una comarca minera. En: Florido, P., Rábano, I. (Eds.). *Una visión multidisciplinar del patrimonio geológico y minero*. Cuadernos del Museo Geominero, nº12. Instituto Geológico y Minero de España, Madrid, pp. 47-61.
- Chalmin, E., Vignaud, C., Salomon, H., Farges, F., Susini, J., Menu, M. 2006. Minerals discovered in paleolithic black pigments by transmission electron microscopy and micro-X-ray absorption near-edge structure. *Applied Physics A-Materials Science & Processing* 83: 213-218.
- Chaminé, H.I., Afonso, M.J., Robalo, P.M., Rodrigues, P., Cortez, C., Monteiro Santos, F.A., Plancha, J.P., Fonseca, P.E., Gomes, A., Devy-Vareta, N.F., Marques, J.M., Lopes, M.E., Fontes, G., Pires, A., Rocha, F. 2010. Urban speleology applied to groundwater and geo-engineering studies: underground topographic surveying of the ancient Arca D'Água galleries catchworks (Porto, NW Portugal). *International Journal of Speleology* 39: 1-14.
- Chan, O.C., Claus, P., Casper, P., Ulrich, A., Lueders, T., Conrad, R. 2005. Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment. *Environmental Microbiology* 7: 1139-1149.
- Chelius, M.K., Moore, J.C. 2004. Molecular phylogenetic analysis of Archaea and Bacteria in Wind Cave, South Dakota. *Geomicrobiology Journal* 21: 123-134.
- Chun, J., Lee, J.H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B.K., Lim, Y.W. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2259-2261.

- Cigna, A.A. 2004. Climate of caves. En: Gunn, J. (Ed.). Encyclopedia of Caves and Karst Science. Taylor & Francis Books Inc., Nueva York, pp. 228-230.
- Cockell, C.S. 2010. Geomicrobiology beyond Earth: microbe–mineral interactions in space exploration and settlement. Trends in Microbiology 18: 308-314.
- Cockell, C.S., Pybus, D., Olsson-Francis, K., Kelly, L., Petley, D., Rosser, N., Howard, K., Mosselmans, F. 2011. Molecular characterization and geological microenvironment of a microbial community inhabiting weathered receding shale cliffs. Microbial Ecology 61: 166-181.
- Coelho Dias, G.J.A. 2010. Tibães: o encanto da Cerca, o silêncio dos monges e os últimos abades gerais dos beneditinos. Museu de S. Marthino de Tibães / Mosteiro de S. Bento da Vitória, p. 116.
- Corstjens, P.L.A.M., De Vrind, J.P.M, Goosenc, T., De Vrind-de Jongd, E.W. 1997. Identification and molecular analysis of the *Leptothrix discophora* SS-1 mofA gene, a gene putatively encoding a manganese-oxidizing protein with copper domains. Geomicrobiology Journal 14: 91-108.
- Cox, G., James, J.M., Legget, K.E.A., Osborne, R.A.L. 1989. Cyanobacterially deposited speleothems: subaerial stromatolites. Geomicrobiology Journal 7: 245-252.
- Cox, G., Salih, A., James, J., Allaway, B. 1995. Confocal microscopy of cyanobacteria in calcite speleothems. Zoological Studies 34: 5-6.
- Cox, T.L., Sly, L.I. 1997. Phylogenetic relationships and uncertain taxonomy of *Pedomicrobium* species. International Journal of Systematic Bacteriology 47: 377-380.
- Crabtree, P.W. 1962. Bog ore from Black Reef Cave. Cave Science 4: 360-361.
- Cuesta, G., Soler, A., Alonso, J.L., Ruvira, M.A., Lucena, T., Arahall, D.R., Goodfellow, M. 2013. *Pseudonocardia hispaniensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from industrial wastewater activated sludge. Antonie Van Leeuwenhoek 103: 135-42.
- Cuezva, S., Cañaveras, J.C., González, R., Lario, J., Luque, L., Sáiz-Jiménez, C., Sánchez-Moral, S., Soler, V. 2003. Origen bacteriano de espeleotemas tipo moonmilk en ambiente karstico (Cueva de Altamira, Cantabria, España). Estudios Geológicos 59: 145-157.
- Cuezva, S., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C., Cañaveras, J.C. 2009. Microbial communities and associated mineral fabrics in Altamira Cave, Spain. International Journal of Speleology 38: 83-92.

Bibliografía

- Cuezva, S., Fernandez-Cortes, A., Porca, E., Pašić, L., Jurado, V., Hernandez-Marine, M., Serrano-Ortiz, P., Hermosin, B., Cañaveras, J.C., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C. 2012. The biogeochemical role of Actinobacteria in Altamira Cave, Spain. *FEMS Microbiology Ecology* 81: 281-290.
- Curry, M.D., Boston, P.J., Spilde, M.N., Baichtal, J.F., Campbell, A.R. 2009. Cottonballs, a unique subaqueous moonmilk, and abundant subaerial moonmilk in Cataract Cave, Tongass National Forest, Alaska. *International Journal of Speleology* 38: 111-128.
- Dams, E., Hendriks, L., Van De Peer, Y., Neefs, J.M., Smits, G., Vandenbempt, I., De Wachter, R. 1988. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research* 16: 87-173.
- Danielli, H.M.C., Edington, M.A. 1983. Bacterial calcification in limestone caves. *Geomicrobiology Journal* 3: 1-16.
- Dartnell, L.R., Desorgher, L., Ward, J.M., Coates, A.J. 2007. Martian sub-surface ionising radiation: biosignatures and geology. *Biogeosciences Discussions, European Geosciences Union (EGU) 2007*, 4: 455-492.
- Daza Brunet, R., Bustillo Revuelta, M.Á. 2014. Exceptional silica speleothems in a volcanic cave: A unique example of silicification and sub-aquatic opaline stromatolite formation (Terceira, Azores). *Sedimentology* 61: 2113-2135.
- Daza, R., Miller, A.Z., Sáiz-Jiménez, C., Gázquez, F., Calaforra, J.M., Forti, P., Rull, F., Medina, J., Sanz-Arranz, A., Martínez-Frías, J., Toulkeridis, T. 2016. Insights into speleothems from lava tubes of the Galapagos Islands (Ecuador): Mineralogy and Biogenicity. Conference paper of the 17th International Vulcanspeleology Symposium, 6-12 February 2016, Hawaii.
- DeBruyn, J.M., Nixon, L.T., Fawaz, M.N., Johnson, A.M., Radosevich, M. 2011. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of Gemmatimonadetes in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 6295-6300.
- De Leo, F., Iero, A., Zammit, G., Urzì, C.E. 2012. Chemoorganotrophic bacteria isolated from biodeteriorated surfaces in cave and catacombs. *International Journal of Speleology* 41: 125-136.
- De los Ríos, A., Bustillo, M.A., Ascaso, C., Carvalho, M.R. 2011. Bioconstructions in ochreous speleothems from lava tubes on Terceira Island (Azores). *Sedimentary Geology* 236: 117-128.

- Dias Costa, M.J. 2002. A cerca do mosteiro de São Martinho de Tibães. Património e Estudos. Instituto Português do Património Arquitectónico (IPPAR), Lisboa 2: 86-95.
- Diaz-Herraiz, M., Jurado, V., Cuezva, S., Laiz, L., Pallecchi, P., Tiano, P., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C. 2013. The actinobacterial colonization of Etruscan paintings. *Scientific Reports* 3: 1440.
- Diaz-Herraiz, M., Jurado, V., Cuezva, S., Laiz, L., Pallecchi, P., Tiano, P., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C. 2014. Deterioration of an Etruscan tomb by bacteria from the order Rhizobiales. *Scientific Reports* 4: 3610.
- Dick, G.J., Clement, B.G., Webb, S.M., Fodrie, F.J., Bargar, J.R., Tebo, B.M. 2009. Enzymatic microbial Mn(II) oxidation and Mn biooxide production in the Guaymas Basin deep-sea hydrothermal plume. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73: 6517-6530.
- Diez, B., Pedros-Alio, C., Marsh, T.L., Massana, R. 2001. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2942-2951.
- Dong, H. 2010. Mineral-microbe interactions: a review. *Frontiers in Earth Sciences* 4: 127-147.
- Dorn, R.I. 1998. Rock coatings. *Developments in Earth Surface Processes*, 6. Elsevier, Amsterdam.
- Dragoni, M., Piombo, A., Tallarico, A. 1995. A model for the formation of lava tubes by roofing over a channel. *Journal of Geophysical Research* 100: 8435-8447.
- Druschel, G.K., Kappler, A. 2015. Geomicrobiology and microbial geochemistry. *Elements* 11: 389-394.
- Dumpiérrez, F., Fernández, M., Fernández, O., García, R., González, A.J., Govantes, F., Mata, M., Muñoz, M. 1997. Las cavidades volcánicas de la Villa de Mazo. *Vulcania* 1: 1-48.
- Dunfield, P.F., Yuryev, A., Senin, P., Smirnova, A.V., Stott, M.B., Hou, S., Ly, B., Saw, J.H., Zhou, Z., Ren, Y., Wang, J., Mountain, B.W., Crowe, M.A., Weatherby, T.M., Bodelier, P.L.E., Liesack, W., Feng, L., Wang, L., Alam, M. 2007. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. *Nature* 450: 879-882.
- Dunfield, P.F., Belova, S.E., Vorob'ev, A.V., Cornish, S.L., Dedysh, S.N. 2010. *Methylocapsa aurea* sp. nov., a facultative methanotroph possessing a

- particulate methane monooxygenase, and emended description of the genus *Methylocapsa*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60: 2659-2664.
- Durán, J.J., López-Martínez, J., Martín de Vidales, J.L., Casas, J., Barea, J. 2001. Moonmilk, un depósito endokárstico singular. Presencia en cavidades españolas. Geogaceta 29: 43-46.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.). 2006. The Prokaryotes, Third Edition. A Handbook on the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses. Volume 5. Springer Science & Business Media, Nueva York.
- Echigo, A., Hino, M., Fukushima, T., Mizuki, T., Kamekura, M., Usami, R. 2005. Endospores of halophilic bacteria of the family *Bacillaceae* isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). Saline Systems 1: 8.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research 32: 1792-1797.
- Edwards, K.J., Bach, W., Rogers, D.R. 2003. Geomicrobiology of the ocean crust: a role for chemoautotrophic Fe-bacteria. Biological Bulletin 204: 180-185.
- Ehrich, S., Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwig, W., Bock, E. 1995. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. Archives of Microbiology 164: 16-23.
- Ekendahl, S., Arlinger, J., Stahl, F., Pedersen, K. 1994. Characterization of attached bacterial populations in deep granitic groundwater from the Stripa research mine by 16s rRNA gene sequencing and scanning electron microscopy. Microbiology 140: 1575-1583.
- Emerson, D., Ghiorse, W.C. 1992. Isolation, cultural maintenance and taxonomy of a sheath-forming strain of *Leptothrix discophora* and characterization of manganese-oxidizing activity associated with the sheath. Applied and Environmental Microbiology 58: 4001-4010.
- Engel, A.S., Porter, M.L., Kinkle, B.K. 2001. Ecological assessment and geological significance of microbial communities from Cesspool Cave, Virginia. Geomicrobiology Journal 18: 259-274.
- Engel, A.S. 2007. Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats. Journal of Cave and Karst Studies 69: 187-206.

- Engel, A.S., Meisinger, D.B., Porter, M.L., Baskar, S., Baskar, R., Lee, N.M. 2008. Cave microbiology as a window into the subsurface. Workshop Proceedings of CAREX meeting. 30 November - 2 December 2008, Sant Feliu de Guixols, Gerona, pp. 66-67.
- Engel, A.S., Paoletti, M.G., Beggio, M., Dorigo, L., Pamio, A., Gomiero, T., Furlan, C., Brilli, M., Dreon, A.L., Bertoni, R., Squartini, A. 2013. Comparative microbial community composition from secondary carbonate (moonmilk) deposits: implications for the *Cansiliella servadeii* cave hygropetric food web. *International Journal of Speleology* 42: 181-192.
- Erfurt-Cooper, P. (Ed.). 2014. *Volcanic Tourist Destinations*. Springer, Heidelberg.
- Espinasa, L., Garvey, R., Espinasa, J., Fratto, C.A., Taylor, S.T., Toulkeridis, T., Addison, A. 2015. Cave dwelling *Onychophora* from a lava tube in the Galapagos. *Subterranean Biology* 15: 1-10.
- Fernandez-Cortes, E., Sanz-Rubio, E., Sanchez-Malo, A., Cuezva, S., Garcia-Anton, E., Sanchez-Moral, S., Afonso, M.J., Chamine, H.I., Hermosin, B. 2014. Detection of urban subsurface pollution by rapid multiparametric surveys in the 16th century Paranhos spring water tunnel (Porto, Portugal). En: Saiz-Jimenez, C. (Ed.). *The Conservation of Subterranean Cultural Heritage*. CRC Press/Balkema, Leiden, pp. 89-94.
- Fernández Lorenzo, O. 2000. Avance global del catálogo de cavidades de La Palma (Islas Canarias). *Vulcania* 4: 77-84.
- Fernández Lorenzo, O. 2007. Avance global del catálogo de cavidades de La Palma (II). (Islas Canarias). *Vulcania* 8: 79-86.
- Fernández Lorenzo, O., Naranjo Morales, M. 2011. Catálogo de Cavidades de la Isla de Gran Canaria (Islas Canarias). *Vulcania* 9: 43-47.
- Fernández, O., Gómez, D., Naranjo, M., Miller, A.Z., Jurado, V. 2015. Nuevas galerías en la Cueva de Los Caños (Mazo, La Palma, Islas Canarias). *Notas sobre espeleometría, biocenosis y microbiología*. 1ª Convención Internacional de Espeleología de Barcelona, 1-3 mayo 2015.
- Fischer, H. 1988. Etymology, terminology, and an attempt of definition of mondmilch. *Bulletin of the National Speleological Society* 50: 4-58.
- Fontes, L. 2005. São Martinho de Tibães: um sítio onde se fez um mosteiro. Ensaio em Arqueologia da Paisagem e da Arquitectura. Coleção Monumentos/Monografias. Instituto Português do Património Arquitectónico (IPPAR), Lisboa.

Bibliografía

- Forti, P., Rossi, A. 1987. Le concrezioni poliminerali della Grotta di Santa Ninfa: un esempio evidente dell'influenza degli equilibri solfuri-solfati sulla minerogenesi carsica. *Atti e Memorie della Commissione Grotte "Eugenio Boegan"* 26: 47-64.
- Forti, P., Salvatori, F. 1988. Un nuovo minerale di grotta: la fibroferrite della Grotta Ferrata. *Rivista Italiana di Mineralogia* 4: 219-226.
- Forti, P. 1994. Los depósitos químicos de la sima Aonda Superior y de otras cavidades del Auyán-Tepui, Venezuela. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Espeleología* 28: 1-4.
- Forti, P. 2000. Mineralogenic mechanisms and cave minerals in the volcanic caves of Mt. Etna (Sicily, Italy). *Mitteilungen des Verbandes der deutschen Höhlen- und Karstforscher e.v. München* 46: 37-41.
- Forti, P. 2005. Genetic processes of cave minerals in volcanic environment: An overview. *Journal of Cave and Karst Studies* 67: 3-13.
- Fortin, D., Ferris, F.G., Beveridge, T.J. 1997. Surface-mediated mineral development by bacteria. En: Banfield, J.F., Nealson, K.H. (Eds.). *Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals*. Mineralogy Society of America, Washington, pp. 161-180.
- Frankel, R.B., Bazylinski, D.A. 2003. Biologically induced mineralization by bacteria. *Reviews in Mineralogy & Geochemistry* 54: 95-114.
- Friedrich, A.J., Hasenmueller, E.A., Catalano, J.G. 2011. Composition and structure of nanocrystalline Fe and Mn oxide cave deposits: implications for trace element mobility in karst systems. *Chemical Geology* 284: 82-96.
- Gabriel, C.R., Northup, D.E. 2013. Microbial ecology: Caves as an extreme habitat. En: Cheeptham, N. (Ed.). *Cave Microbiomes: A novel Resource for Drug Discovery*. SpringerBriefs in Microbiology, Nueva York, Volume 1, pp. 85-108.
- Gallardo, G., Toulkeridis, T. 2008. *Volcanic Caves and Other Speleological Attractions*. Santa Cruz, Galápagos. First Edition. San Francisco University Press, Quito.
- García, R., González, A.J. 1998. Estudio faunístico de la cueva del Llano de los Caños (La Palma, Islas Canarias). *Vieraea* 26: 113-119.
- Garcia, M.G., Moya, M., Spilde, M.N., Stone, F.D., Northup, D.E. 2009. Discovering new diversity in Hawaiian lava tube microbial mats. *Proceedings of the 15th International Congress of Speleology*. 19-26 July 2009, Kerrville, Texas, 1: 364-369.

- Garcia Cacho, L., Anguita, F., Arana, V., Barberi, F., Diez-Gil, J., Ortiz, R., Sbrana, A. 1987. Una nueva perspectiva de la Formación Roque Nublo (Gran Canaria). *Boletín Geológico y Minero* 98: 133-137.
- Gebers, R., Beese, M. 1998. *Pedomicrobium americanum* sp. nov., and *Pedomicrobium australicum* sp. nov., from aquatic habitats, *Pedomicrobium* gen. emend. and *Pedomicrobium* sp. emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 38: 303-315.
- Geesey, G.G., Borch, T., Reardon, C.L. 2008. Resolving biogeochemical phenomena at high spatial resolution through electron microscopy. *Geobiology* 6: 263-269.
- Geszvain, K., McCarthy, J.K., Tebo, B.M. 2013. Elimination of Manganese (II,III) oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1 by a double knockout of two putative multicopper oxidase genes. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 357-366.
- Ghiorse, W.C. 1984. Biology of iron-and-manganese-depositing bacteria. *Annual Review of Microbiology* 38: 515-550.
- Ghosh, W., George, A., Agarwal, A., Raj, P., Alam, M., Pyne, P., Das Gupta, S.K. 2011. Whole-genome shotgun sequencing of the sulfur-oxidizing chemoautotroph *Tetrathiodibacter kashmirensis*. *Journal of Bacteriology* 193: 5553-5554.
- Gillieson, D. 1996. *Caves: Processes, Development and Management*. Blackwell, Oxford.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L. y Field, K.G. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345: 60-63.
- Giovannoni, S.J. 1991. The polymerase chain reaction. En: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.). *Sequencing and Hybridization Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons, Nueva York, pp. 177-201.
- Giovanoli, R. 1969. A simplified scheme for the polymorphism in the manganese dioxides. *Chimia* 23: 470-472.
- Gomez-Alvarez, V., King, G.M., Nusslein, K. 2007. Comparative bacterial diversity in recent Hawaiian volcanic deposits of different ages. *FEMS Microbiology Ecology* 60: 60-73.
- Gonçalves, H., Sequeira, F., Teixeira, J.L., Grosso, J.M. 2000. Estudo da biodiversidade da Cerca do Mosteiro de S. Martinho de Tibães: inventário faunístico e medidas de conservação. Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (CIBIO), Porto.

Bibliografía

- González-Muñoz, M.T., Ben Omar, N., Martínez-Cañamero, M., Rodríguez-Gallego, M., Galindo, A.L., Arias, J.M. 1996. Struvite and calcite crystallization induced by cellular membranes of *Myxococcus xanthus*. *Journal of Crystal Growth* 163: 434-439.
- Gray, M. 2004. *Geodiversity. Valuing and Conserving Abiotic Nature*. John Wiley & Sons, Sussex.
- Greeley, R. 1971. Lava tubes and channels in the lunar Marius Hills. *The Moon* 3: 289-314.
- Greeley, R., Spudis, P.D. 1981. Volcanism on Mars. *Reviews of Geophysics and Space Physics* 19: 13-41.
- Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., Bailey, M.J. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5488-5491.
- Griffiths, P., De Haseth, J.A. 2007. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, 2nd edition. Wiley-Interscience, Hoboken.
- Groth, I., Saiz-Jimenez, C. 1999. Actinomycetes in hypogean environments. *Geomicrobiology Journal* 16: 1-8.
- Groth, I., Schumann, P., Laiz, L., Sanchez-Moral, S., Cañaveras, J.C., Saiz-Jimenez, C. 2001. Geomicrobiological study of the Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy. *Geomicrobiology Journal* 18: 241-258.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hathaway, J.J.M. 2010. *Molecular Phylogenetic Investigation of Microbial Diversity and Nitrogen Cycling in Lava Tubes*. MS Thesis. University of New Mexico, New Mexico.
- Hathaway, J.J.M., Garcia, M.G., Balasch, M.M., Spilde, M.N., Stone, F.D., Dapkevicius, M.L.N.E., Amorim, I.R., Gabriel, R., Borges, P.A.V., Northup, D.E. 2014a. Comparison of Bacterial Diversity in Azorean and Hawai'ian Lava Cave Microbial Mats. *Geomicrobiology Journal* 31: 205-220.
- Hathaway, J.J.M., Sinsabaugh, R.L., Dapkevicius, M.L.N.E., Northup, D.E. 2014b. Diversity of Ammonia Oxidation (*amoA*) and Nitrogen Fixation (*nifH*) Genes in Lava Caves of Terceira, Azores, Portugal. *Geomicrobiology Journal* 31: 221-235.

- He, X., McLean, J.S., Edlund, A., Yooseph, S., Hall, A.P., Liu, S.Y., Dorrestein, P.C., Esquenazi, E., Hunter, R.C., Cheng, G., Nelson, K.E., Lux, R., Shi, W. 2014. Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 244-249.
- He, S., Tominski, C., Kappler, A., Behrens, S., Roden, E.E. 2016. Metagenomic analyses of the autotrophic Fe(II)-oxidizing, nitrate-reducing enrichment culture KS. *Applied and Environmental Microbiology* 82: 2656-2668.
- Herrera, A., Cockell, C.S. 2007. Exploring microbial diversity in volcanic environments: A review of methods in DNA extraction. *Journal of Microbiological Methods* 70: 1–12.
- Hiebert, F.K., Bennet, P.C. 1992. Microbial control of silicate weathering in organic-rich ground water. *Science* 258: 278-281.
- Hill, C.A. 1982. Origin of black deposits in caves. *Bulletin of the National Speleological Society* 44: 15-19.
- Hill, C.A., Forti, P. (Eds.). 1997. *Cave Minerals of the World*. Second Edition. National Speleological Society. Huntsville.
- Hose L.D., Pisarowcz, J.A. 1999. Cueva de Villa Luz, Tabasco, Mexico: reconnaissance study of an active sulfur spring cave and ecosystem. *Journal of Cave and Karst Studies* 61: 13-21.
- Hose, L.D., Palmer, A.N., Palmer, M.V., Northup, D.E., Boston, P.J., Duchene, H.R. 2000. Microbiology and geochemistry in a hydrogen-sulphide-rich karst environment. *Chemical Geology* 169: 399-423.
- Howarth, F.G. 1981. Community structure and niche differentiation in Hawaiian lava tubes. En: Mueller Dombois, D., Bridges, K.W., Carson, H.L. (Eds.). *Island Ecosystems: Biological Organization in Selected Hawaiian Communities*. Hutchinson Ross Publishing Company, Stroudsburg, pp. 318-336.
- Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R. 1998. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology* 180: 4765-4774.
- Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Ricketts, T.H., Bohannon, B.J.M. 2001. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4399-4406.
- Huys, G., Vanhoutte, T., Joossens, M., Mahious, A.S., De Brandt, E., Vermeire, S., Swings, J. 2008. Coamplification of eukaryotic DNA with 16S rRNA gene-based

- PCR primers: possible consequences for population fingerprinting of complex microbial communities. *Current Microbiology* 56: 553-557.
- Hyde, J.H., Greeley, R. 1973. Geological field trip guide, Mount St. Helens lava tubes, Washington. En: Beaulieu, J.D. (Ed.). *Geologic Field Trips in Northern Oregon and Southern Washington*. Department of Geology and Mineral Industries, Oregon, Bulletin 77, pp. 183-206.
- Im, W.T., Liu, Q.M., Yang, J.E., Kim, M.S., Kim, S.Y., Lee, S.T., Yi, T.H. 2010. *Panacagrimonas perspica* gen. nov., sp. nov., a novel member of Gammaproteobacteria isolated from soil of a ginseng field. *Journal of Microbiology* 48: 262-266.
- Itoh, T., Yamanoi, K., Kudo, T., Ohkuma, M., Takashina, T. 2011. *Aciditerrimonas ferrireducens* gen. nov., sp. nov., an iron-reducing thermoacidophilic actinobacterium isolated from a solfataric field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 1281-1285.
- Jakosky, B.M., Shock, E.L. 1998. The biological potential of Mars, the early Earth, and Europa. *Journal of Geophysical Research* 103: 19359-19364.
- Jägevall, S., Rabe, L., Pedersen, K. 2011. Abundance and Diversity of Biofilms in Natural and Artificial Aquifers of the Äspö Hard Rock Laboratory, Sweden. *Microbial Ecology* 61: 410-422.
- Johnson, D.B., Macvicar, J.H.M., Rolfe, S. 1987. A new solid medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 7: 9-18.
- Johnson, H.A., Tebo, B.M. 2008. In vitro studies indicate a quinone is involved in bacterial Mn(II) oxidation. *Archives of Microbiology* 189: 59-69.
- Jones, B. 1992. Manganese precipitates in the karst terrain of Grand Cayman, British West Indies. *Canadian Journal of Earth Sciences* 29: 1125-1139.
- Jones, B. 2009. Cave pearls - The integrated product of abiogenic and biogenic processes. *Journal of Sedimentary Research* 79: 689-710.
- Jones, D.S., Albrecht, H.L., Dawson, K.S., Schaperdoth, I., Freeman, K.H., Pi, Y., Pearson, A., Macalady, J.L. 2012. Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm. *The ISME Journal* 6: 158-170.
- Julien, C.M., Massot, M., Poinsignon, C. 2004. Lattice vibrations of manganese oxides Part I. Periodic structures. *Spectrochimica Acta Part A* 60: 689-700.

- Jurado, V., Laiz, L., Rodriguez-Nava, V., Boiron, P., Hermosin, B., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C. 2010. Pathogenic and opportunistic microorganisms in caves. *International Journal of Speleology* 39: 15-24.
- Kalb, V.F., Bernlohr, R.W. 1977. A new spectrophotometric assay for protein in cells extracts. *Analytical Biochemistry* 82: 362-371.
- Kanokratana, P., Chanapan, S., Pootanakit, K., Eurwilaichitr, L. 2004. Diversity and abundance of bacteria and archaea in the Bor Khlueng Hot Spring in Thailand. *Journal of Basic Microbiology* 44: 430-444.
- Kashima, N. 1983. On the wad-minerals from the cavern environment. *International Journal of Speleology* 13: 67-71.
- Kashima, N. 1986. Cave formations from noncalcareous caves in Kyushu, Japan. *Proceedings of the 9th International Congress of Speleology, Barcelona*, 2: 41-43.
- Kashima, N., Irie, T., Kinoshita, N. 1987. Diatom, contributors of coralloid speleothems, from Togawa-Sakaidani-Do cave in Miyazaki Prefecture, Central Kyushu, Japan. *International Journal of Speleology* 16: 95-100.
- Kelly, L.C., Cockell, C.S., Piceno, Y.M., Andersen, G.L., Thorsteinsson, T., Marteinsson, V. 2010. Bacterial diversity of weathered terrestrial Icelandic volcanic glasses. *Microbial Ecology* 60: 740-752.
- Keszthelyi, L., Jaeger, W.L., Milazzo, M.P., McEwen, A.S. HiRISE Team. 2007. High resolution imaging science experiment (HiRISE) images of volcanic terrains from the first 6 months of the Mars reconnaissance orbiter primary science phase. *Seventh International Conference on Mars*, Abstract #3314.
- Keszthelyi, L., Jaeger, W., McEwen, A., Tornabene, L., Beyer, R.A., Dundas, C., Milazzo, M. 2008. High Resolution Imaging Science Experiment (HiRISE) images of volcanic terrains from the first 6 months of the Mars Reconnaissance Orbiter Primary Science Phase. *Journal of Geophysical Research* 113, E04005.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S., Chun, J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 716-721.
- King, G.M. 2007. Chemolithotrophic bacteria: Distributions, functions and significance in volcanic environments. *Microbes and Environments* 22: 309-319.
- Konhauser, K.O., Urrutia, M.M. 1999. Bacterial clay authigenesis: a common biogeochemical process. *Chemical Geology* 161: 399-413.

- Konhauser, K.O. 2007. Introduction to Geomicrobiology. Blackwell publishing.
- Krumbein, W.E., Altmann, H.J. 1973. A new method for the detection and enumeration of manganese oxidizing and reducing microorganisms. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 25: 347-356.
- Kunicka-Goldfinger, W. 1982. Preliminary observations on the microbiology of karst caves of the Sarisariñama plateau in Venezuela. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Espeleología* 10: 133-136.
- Laaksoharju, M., Pedersen, K., Rhen, I., Skannan, C., Tullborg, E.-L., Wallin, B., Wikberg, W. 1995. Sulphate reduction in the Aspo HRL tunnel. SKB Technical Report 95-25. Swedish Nuclear Fuel and Waste Management Co., Stockholm.
- Laiz, L., Groth, I., Gonzalez, I., Saiz-Jimenez, C. 1999. Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain). *Journal of Microbiological Methods* 36: 129-138.
- Laiz, L., Groth, I., Schumann, P., Zezza, F., Felske, A., Hermosin, B., Saiz-Jimenez, C. 2000. Microbiology of the stalactites from Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy. *International Microbiology* 3: 25-30.
- Laiz, L., Gonzalez, J.M., Saiz-Jimenez, C. 2003. Microbial communities in caves: Ecology, physiology, and effects on paleolithic paintings. En: Koestler, R.J., Koestler, V.R., Carola, A.E., Nieto-Fernández, F.E. (Eds). *Art, Biology, and Conservation: Biodeterioration of Works of Art. The Metropolitan Museum of Art, Nueva York*, pp. 210-225.
- Learman, D.R., Voelker, B.M., Vazquez-Rodriguez, A.I., Hansel, C.M. 2011. Formation of manganese oxides by bacterially generated superoxide. *Nature Geoscience* 4: 95-98.
- Lee, N.M., Meisinger, D.B., Aubrecht, R., Kovacik, L., Saiz-Jimenez, C., Baskar, S., Baskar, R., Liebl, W., Porter, M., Engel, A.S. 2012. Caves and karst environments. En: Bell, E.M. (Ed.). *Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival*. CAB International, Oxfordshire, pp. 320-344.
- Léveillé, R.J., Datta, S. 2010. Lava tubes and basaltic caves as astrobiological targets on Earth and Mars: A review. *Planetary and Space Science* 58: 592-598.
- Lie, A.A.Y., Liu, Z., Hu, S.K., Jones, A.C., Kim, D.Y., Countway, P.D., Amaral-Zettler, L.A., Cary, S.C., Sherr, E.B., Sherr, B.F., Gast, R.J., Carona, D.A. 2014. Investigating microbial eukaryotic diversity from a global census: Insights from a comparison of pyrotag and full-length sequences of 18s rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 4363-4373.

- Lopes, M.E., Meixedo, P., Neto, E.P., Pereira, L.C.G., Gomes, A.A., Afonso, M.J., Costa, M.J.D., Trigo, J.F.C., Chaminé, H.I. 2008. Metodologias interdisciplinares em estudos de geoconservação de património geológico-mineiro: o caso da antiga mina de volfrâmio das Azeiteiras (Mina de Tibães). Actas do V Seminário Recursos Geológicos, Ambiente e Ordenamento do Território. Vila Real (Portugal). 16-18 outubro 2008. Universidade de Trás-os-Montes e Alto-Douro, pp. 91-97.
- Lopes, M.E. 2012. Geoconservação e valorização do património geológico-mineiro de espaços subterrâneos antigos. Tese de doutoramento. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Lowe, R.L., Kocielek, J.P., Van de Vijver, B. 2013. Two new *Orthoseira* species (Bacillariophyceae) from lava tubes on Île Amsterdam and Big Island (Hawai'i). *Phytotaxa* 111: 39-52.
- Lowenstam, H.A. 1981. Minerals formed by organisms. *Science* 211: 1126-1131.
- Lowenstam, H.A., Weiner, S. 1989. On Biomineralization. Oxford University Press, Nueva York.
- Lynch, J.M., Poole, N.J. 1979. *Microbial Ecology: A Conceptual Approach*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Maciejewska, M., Pessi, I.S., Arguelles-Arias, A., Noirfalise, P., Luis, G., Ongena, M., Barton, H., Carnol, M., Rigali, S. 2015. *Streptomyces lunaelactis* sp. nov., a novel ferroverdin A-producing *Streptomyces* species isolated from a moonmilk speleothem. *Antonie van Leeuwenhoek* 107: 519-531.
- Mann, S. 2001. *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. Oxford University Press, Nueva York.
- Manolache, E., Onac, B.P. 2000. Geomicrobiology of black sediments in Vântului Cave (Romania): preliminary results. *Cave and Karst Science* 27: 109-112.
- Manz, W., Sibylle, K., Szewzyk, U. 2006. Genus Incertae Sedis XI. *Aquabacterium*. En: Brenner, D.J., Krieg, N.R. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second edition, Volume Two: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- and Epsilonproteobacteria. Springer Science & Business Media, Nueva York, pp. 735-738.
- Martin-Sanchez, P., Novakova, M.A., Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. 2012. Use of biocides for the control of fungal outbreaks in subterranean environments: The case of the Lascaux Cave in France. *Environmental Science & Technology* 46: 3762-3770.

- Martínez-Arkarazo, I., Angulo, M., Zuloaga, O., Usobiaga, A., Madariaga, J.M. 2007. Spectroscopic characterisation of moonmilk deposits in Pozalagua tourist Cave (Karrantza, Basque Country, North of Spain). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 68: 1058-1064.
- Mata, A.M.R. 2002. Fragmentos do Mosteiro de São Martinho de Tibães. *Património e Estudos*. Instituto Português do Património Arquitectónico (IPPAR), Lisboa 2: 80-85.
- Matheson, C.D., Gurney, C., Esau, N., Lehto, R. 2010. Assessing PCR Inhibition from Humic Substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal* 3: 38-45.
- McLean, J.S., Beveridge, T.J., Phipps, D. 2000. Isolation and characterization of a chromium-reducing bacterium from a chromated copper arsenate-contaminated site. *Environmental Microbiology* 2: 611-619.
- Mechichi, T., Stackebrandt, E., Gad'on, N., Fuchs, G. 2002. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov. *Archives of Microbiology* 178: 26-35.
- Mejía, C.V., Brandt, S. 2015. Managing tourism in the Galapagos Islands through price incentives: A choice experiment approach. *Ecological Economics* 117: 1–11.
- Melim, L.A., Northup, D.E., Spilde, M.N., Jones, B., Boston, P.J., Bixby, R.J. 2008. Reticulated filaments in cave pool speleothems: microbe or mineral? *Journal of Cave and Karst Studies* 70: 135-141.
- Melim, L.A., Northup, D.E., Spilde, M.N., Boston, P.J. 2015. Update: Living reticulated filaments from Herbstlabyrinth-Adventhöhle cave system, Germany. *Journal of Cave and Karst Studies* 77: 87-90.
- Mergaert, J., Cnockaert, M.C., Swings, J. 2002. *Phyllobacterium myrsinacearum* (subjective synonym *Phyllobacterium rubiacearum*) emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1821-1823.
- Miller, A.Z., Dionísio, A., Sequeira Braga, M.A., Afonso, M.J., Jurado, V., Fernandez-Cortes, A., Cuezva, S., Sanchez-Moral, S., Saiz-Jimenez, C., Chaminé, H. 2011. Manganese oxides as biominerals in a granitic subterranean environment. En: Meckenstock, R. (Ed.). *Microbial Life Below Our Feet, Principles and Challenges of Subsurface Ecosystems*. ISSM 2011 8th International Symposium of Subsurface Microbiology, 11-16 September 2011, Helmholtz Zentrum München, p. 81.

- Miller, A.Z., Dionísio, A., Sequeira Braga, M.A., Hernández-Mariné, M., Afonso, M.J., Muralha, V.S.F., Herrera, L.K., Raabe, J., Fernandez-Cortes, A., Cuezva, S., Hermosin, B., Sanchez-Moral, S., Chaminé, H., Saiz-Jimenez, C. 2012a. Biogenic Mn oxide minerals coating in a subsurface granite environment. *Chemical Geology* 322-323: 181-191.
- Miller, A.Z., Hernández-Mariné, M., Jurado, V., Dionísio, A., Barquinha, P., Fortunato, E., Afonso, M.J., Chaminé, H.I., Saiz-Jimenez, C. 2012b. Enigmatic reticulated filaments in subsurface granite. *Environmental Microbiology Reports* 4: 596-603.
- Miller, A.Z., Dionísio, A., Saiz-Jimenez, C. 2012c. Microorganisms in caves: unusual morphologies. En: Durán, J.J., Robledo, P.A. (Eds.). *Las Cuevas Turísticas como Activos Económicos: Conservación e Innovación*. Asociación de Cuevas Turísticas Españolas (ACTE), Madrid, pp. 309-319.
- Miller, A.Z., Dionísio, A., Jurado, V., Cuezva, S., Sanchez-Moral, S., Cañaveras, J.C., Saiz-Jimenez, C. 2013. Biomineralization by cave dwelling microorganisms. En: Sanjurjo Sánchez, J. (Ed.). *Advances in Geochemistry Research*. Nova Science Publishers, pp. 77-105.
- Miller, A.Z., Dionisio, A., Lopes, M.E., Afonso, M.J., Chamine, H.I. 2014a. Microbe-mineral interactions at a Portuguese geo-archaeological site. En: Saiz-Jimenez, C. (Ed.). *The Conservation of Subterranean Cultural Heritage*. CRC Press/Balkema, Leiden, pp. 103-111.
- Miller, A.Z., Pereira, M.F.C., Calaforra, J.M., Forti, P., Dionisio, A., Saiz-Jimenez, C. 2014b. Siliceous speleothems and associated microbe-mineral interactions from Ana Heva Lava tube in Easter Island (Chile). *Geomicrobiology Journal* 31: 236-245.
- Miller, A.Z., De la Rosa, J.M., Pereira, M.F.C., Garcia-Sanchez, A.M., Jurado, V., Fernández, O., González-Pérez, J.A., Saiz-Jimenez, C. 2016. Honey-like scented deposits in a lava tube from La Palma Island (Spain). 21st International Symposium on Analytical and Applied Pyrolysis. 9-12 mayo, Nancy, Francia.
- Miyata, N., Tani, Y., Iwahori, K., Soma, M. 2004. Enzymatic formation of manganese oxides by an *Acremonium*-like hyphomycete fungus, strain KR21-2. *FEMS Microbiology Ecology* 47: 101-109.
- Miyata, N., Tani, Y., Maruo, K., Tsuno, H., Sakata, M., Iwahori, K. 2006. Manganese(IV) oxide production by *Acremonium* sp. strain KR21-2 and extracellular Mn(II) oxidase activity. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 6467-6473.

Bibliografía

- Moore, G.W. 1952. Speleothem - a new cave term. National Speleological Society News 10: 2.
- Moore, G.W., Sullivan, G.N. 1978. Speleology: the Study of Caves, Revised Second Edition. San Luis, Misuri: Cave Books, Inc.
- Moore, R.L. 1981. The Biology of *Hyphomicrobium* and other prosthecate, budding bacteria. Annual Review of Microbiology 35: 567-594.
- Moore, E.R.B., Norrod, E.P., Jurtshuk, P. Jr. 1984. Superoxide dismutases of *Azotobacter vinelandii* and other aerobic, free-living nitrogen-fixing bacteria. FEMS Microbiology Letters 24: 261-265.
- Morgan, J.J. 2000. Manganese in natural waters and earth's crust: its availability to organisms. Metal Ions in Biological Systems 37: 1-34.
- Moya, M., Garcia, M.G., Spilde, M.N., Northup, D.E. 2009. Composition of bacterial mats in El Malpais National Monument, New Mexico, USA: Comparison and contrasts with bacterial communities in Hawaii lava tubes. Proceedings of the 15th International Congress of Speleology. 19-26 July 2009, Kerrville, Texas, 2: 709-713.
- Mulet, M., David, Z., Nogales, B., Bosch, R., Lalucat, J., García-Valdés, E. 2011. *Pseudomonas* diversity in crude-oil-contaminated intertidal sand samples obtained after the Prestige Oil spill. Applied and Environmental Microbiology 77: 1076-1085.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding of 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology 59: 695-700.
- Muyzer, G., Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Van Leeuwenhoek 73: 127-141.
- Myers, E.W., Miller, W. 1988. Optimal alignments in linear space. Computer Applications in the Biosciences 4: 11-17.
- Naranjo, M., Martín, S., Fernández, O. 2014. De Aslobas a Fataga - Viaje al subsuelo de la Reserva de la Biosfera de Gran Canaria. Sociedad Entomológica Canaria Melansis.
- Nealson, K.H., Ford, J. 1980. Surface enhancement of bacterial manganese oxidation: Implications for aquatic environments. Geomicrobiology Journal 2: 21-37.

- Nealson, K.H. 2006. The manganese-oxidizing bacteria. *Prokaryotes* 5: 222-231.
- Nelson, Y.M., Lion, L.W., Shuler, M.L., Ghiorse, W.C. 2002. Effect of oxide formation mechanisms on lead adsorption by biogenic manganese (hydr)oxides, iron (hydr)oxides, and their mixtures. *Environmental Science & Technology* 36: 421-425.
- Northup, D.E., Reysenbach, A.L., Pace, N.R. 1997. Microorganisms and Speleothems. En: Hill, C.A., Forti, P. (Eds.). *Cave Minerals of the World*. Second Edition. National Speleological Society, Huntsville, pp. 261-266.
- Northup, D.E., Welbourn, W.C. 1997. Life in the twilight zone: Lava tube ecology. *New Mexico Bureau of Mines and Mineral Resources Bulletin* 156: 69-82.
- Northup, D.E., Dahm, C.N., Melim, L.A., Spilde, M.N., Crossey, L.J., Lavoie, K.H., Mallory, L.M., Boston, P.J., Cunningham, K.I., Barns, S.M. 2000. Evidence for geomicrobiological interactions in Guadalupe caves. *Journal of Cave and Karst Studies* 62: 80-90.
- Northup, D.E., Lavoie, K.H. 2001. Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiology Journal* 18: 199-222.
- Northup, D.E., Barns, S.M., Yu, L.E., Spilde, M.N., Schelble, R.T., Dano, K.E., Crossey, L.J., Connolly, C.A., Boston, P.J., Natvig, D.O., Dahm, C.N. 2003. Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves. *Environmental Microbiology* 5: 1071-1086.
- Northup, D.E., Connolly, C.A., Trent, A., Peck, V.M., Spilde, M.N., Welbourn, W.C., Natvig, D.O. 2008. The nature of bacterial communities in Four Windows Cave, El Malpais National Monument, New Mexico, USA. *The AMCS Bulletin* 19: 119-125.
- Northup, D.E., Melim, L.A., Spilde, M.N., Hathaway, J.J.M., Garcia, M.G., Moya, M., Stone, F.D., Boston, P.J., Dapkevicius, M.L., Riquelme, C. 2011. Lava cave microbial communities within mats and secondary mineral deposits: implications for life detection on other planets. *Astrobiology* 11: 1-18.
- Oaki, Y., Imai, H. 2007. One-pot synthesis of manganese oxide nanosheets in aqueous solution: Chelation-mediated parallel control of reaction and morphology. *Angewandte Chemie International Edition* 46: 4951-4955.
- Oliveira, A.A. 1974. A abadia de Tibães e o seu dominio (1630-1680): estudo social e económico. Publicações da Faculdade de Letras do Porto. Universidade do Porto.

- de Oliveira Marques, A.H. 1972. History of Portugal, from Lusitania to Empire. Volume 1. Columbia University Press, Nueva York.
- Onac, B.P., Pedersen, R.B., Tysseland, M. 1997. Presence of rare-earth elements in black ferromanganese coatings from Vântului Cave (Romania). *Journal of Cave and Karst Studies* 59: 128-131.
- Onac, B.P. 2000. *Geology of Karst Terrains*. Didactica si Pedagogica, Bucarest.
- Onac, B.P., Forti, P. 2011a. State of the art and challenges in cave minerals studies. *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Geologia* 56: 33-42.
- Onac, B.P., Forti, P. 2011b. Minerogenetic mechanisms occurring in the cave environment: an overview. *International Journal of Speleology* 40: 79-98.
- Onac, B.P. 2012. Minerals. En: White, W.B., Culver, D.C. (Eds.). *Encyclopedia of Caves* (Second Edition). Elsevier Academic Press, Chennai, pp. 499-508.
- Palmer, A.N. 2007. *Cave Geology*. Cave Books, Dayton.
- Parikh, S.J., Chorover, J. 2005. FTIR Spectroscopic Study of Biogenic Mn-Oxide Formation by *Pseudomonas putida* GB-1. *Geomicrobiology Journal* 22: 207-218.
- Pašić, L., Lovče, B., Sket, B., Herzog-Velikonja, B. 2010. Diversity of microbial communities colonizing the walls of a karstic cave in Slovenia. *FEMS Microbiology Ecology* 71: 50-60.
- Peck, S.B. 1986. Bacterial deposition of iron and manganese oxides in North American caves. *Bulletin of the National Speleological Society* 48: 26-30.
- Pedersen, K., Ekendahl, S. 1990. Distribution and activity of bacteria in deep granitic groundwaters of southeastern Sweden. *Microbial Ecology* 20: 37-52.
- Pedersen, K. 1993. The deep subterranean biosphere. *Earth-Science Reviews* 34: 243-260.
- Pedersen, K. 1997. Microbial life in deep granitic rock. *FEMS Microbiology Reviews* 20: 399-414.
- Pedersen, K. 2012. Subterranean microbial populations metabolize hydrogen and acetate under in situ conditions in granitic groundwater at 450 m depth in the Äspö Hard Rock Laboratory, Sweden. *FEMS Microbiology Ecology* 81: 217-229.
- Pedersen, K. 2013. Metabolic activity of subterranean microbial communities in deep granitic groundwater supplemented with methane and H₂. *The ISME Journal* 7: 839-849.

- Pérez-González, T., Valverde-Tercedor, C., Jiménez-López, J. 2010. Bacterial biomineralization of magnetite and its applications. *Seminarios de la Sociedad Española de Mineralogía (SEM)* 7: 58-74.
- Pla, C., Galiana-Merino, J.J., Cuevas-González, J., Andreu, J.M., Cañaveras, J.C., Cuezva, S., Fernández-Cortés, A., García-Antón, E., Sánchez-Moral, S., Benavente, D. 2015. Definition of microclimatic conditions in a Karst cavity: Rull cave (Alicante, Spain). *Environmental Earth Sciences* 1: 497-503.
- Poehlein, A., Kusian, B., Friedrich, B., Daniel, R., Bowien, B. 2011. Complete genome sequence of the type strain *Cupriavidus necator* N-1. *Journal of Bacteriology* 193: 5017.
- Polyak, V.J., Provencio, P.P. 2006. Protecting Lava tube Caves. En: Hildreth-Werker, V., Werker, J.C. (Eds.). *Cave Conservation and Restoration*. National Speleological Society, Huntsville, pp. 133-140.
- Popa, R., Smith, R. A., Popa, R., Boone, J., Fisk, M. 2012. Olivine-respiring bacteria isolated from the rock-ice Interface in a lava-tube cave, a Mars analogue environment. *Astrobiology* 12: 9-18.
- Porca, E., Jurado, V., Martín-Sánchez, P.M., Hermosin, B., Bastián, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C. 2011. Aerobiology: an ecological indicator for early detection and control of fungal outbreaks in caves. *Ecological Indicators* 11: 1594-1598.
- Portillo, M.C., Gonzalez, J.M. 2008. Microbial communities and immigration in volcanic environments of Canary Islands (Spain). *Naturwissenschaften* 95: 307-315.
- Portillo, M.C., Gonzalez, J.M., Saiz-Jimenez, C. 2008. Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain. *Journal of Applied Microbiology* 104: 681-691.
- Portillo, M.C., Saiz-Jimenez, C., Gonzalez, J.M. 2009. Molecular characterization of total and metabolically active bacterial communities of “white colonizations” in the Altamira Cave, Spain. *Research in Microbiology* 160: 41-47.
- Potter, R.M., Rossman, G.R. 1979. The tetravalent manganese oxides: identification, hydration, and structural relationships by infrared spectroscopy. *American Mineralogist* 64: 1199-1218.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W.G., Peplies, J., Glöckner, F.O. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* 35: 7188-7196.

Bibliografia

- Pruesse, E., Peplies, J., Glöckner, F.O. 2012. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* 28: 1823-1829.
- Rahul, K., Azmatunnisa, M., Sasikala, Ch., Ramana, Ch.V. 2015. *Hoeflea olei* sp. nov., a diesel-oil-degrading, anoxygenic, phototrophic bacterium isolated from backwaters and emended description of the genus *Hoeflea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 2403-2409.
- Rasmussen, B., Blake, T.S., Fletcher, I.R., Kilburn, M.R. 2009. Evidence for microbial life in synsedimentary cavities from 2.75 Ga terrestrial environments. *Geology* 37: 423-426.
- Rastogi, G., Tech, J.J., Coaker, G.L., Leveau, J.H.J. 2010. A PCR-based toolbox for the culture-independent quantification of total bacterial abundances in plant environments. *Journal of Microbiological Methods* 83: 127-132.
- Rebello da Costa, A. 1788. Descrição topográfica e histórica da cidade do Porto. 3ª edição (fac-simile), Editora Frenesi, Lisboa.
- Reitschuler, C., Lins, P., Wagner, A.O., Illmer, P. 2014. Cultivation of moonmilk-born non-extremophilic Thaum and Euryarchaeota in mixed culture. *Anaerobe* 29: 73-79.
- Reynard, E. 2003. Geosite. En: Goudie, A.S. (Ed.). *Encyclopedia of Geomorphology*. Vol. 1. Routledge, Londres.
- Rheims, H., Rainey, F.A., Stackebrandt, E. 1996. A molecular approach to search for diversity among bacteria in the environment. *Journal of Industrial Microbiology* 17: 159-169.
- Richter, D.K., Immenhauser, A., Neuser, R.D. 2008. Electron backscatter diffraction documents randomly orientated c-axes in moonmilk calcite fibres: Evidence for biologically induced precipitation. *Sedimentology* 55: 487-497.
- Ridge, J.P., Lin, M., Larsen, E.I., Fegan, M., McEwan, A.G., Sly, L.I. 2007. A multicopper oxidase is essential for manganese oxidation and laccase-like activity in *Pedomicrobium* sp. ACM 3067. *Environmental Microbiology* 9: 944-953.
- Riding, R. 2000. Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms. *Sedimentology* 47: 179-214.
- Riedel, S.J., Sakimoto, S.E.H. 2002. MOLA topographic constraints on lava tube effusion rates for Alba Patera, Mars. 33rd Lunar and Planetary Science Conference. Abstract#1410.

- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., Stanier, R.Y. 1979. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111: 1-61.
- Riquelme, C., Hathaway, J.J.M., Dapkevicius, M.L.N.E., Miller, A.Z., Kooser, A., Northup, D.E., Jurado, V., Fernandez, O., Saiz-Jimenez, C., Cheeptham, N. 2015. Actinobacterial Diversity in Volcanic Caves and Associated Geomicrobiological Interactions. *Frontiers in Microbiology* 6: 1342.
- Rivadeneira, M.A., Delgado, R., Del Moral, A., Ferrer, M. R., Ramos-Cormenzana, A. 1994. Precipitation of calcium carbonate by *Vibrio* spp. from an inland saltern. *FEMS Microbiology Ecology* 13: 197-204.
- Rivadeneira, M.A., Párraga, J., Delgado, R., Ramos-Cormenzana, A., Delgado, G. 2004. Biomineralization of carbonates by *Halobacillus trueperi* in solid and liquid media with different salinities. *FEMS Microbiology Ecology* 48: 39-46.
- Rogers, B.W., Williams, K.M. 1982. Mineralogy of Lilburn Cave, Kings Canyon National Park, California. *Bulletin of the National Speleological Society* 44: 23-31.
- Rogers, N. 1999. The composition and origin of magmas. En: Sigurdsson, H., Houghton, B., McNutt, S., Rymer, H., Stix, J. (Eds.). *The Encyclopedia of Volcanoes*. Academic Press, Londres, pp. 93-112.
- Rogg, H., Buddenhagen, C., Causton, C. 2005. Experiences and limitations with pest risk analysis in the Galapagos Islands. En: Identification of Risks and Management of Invasive Alien Species Using the IPPC Framework. Proceedings of the Workshop on Invasive Alien Species and the International Plant Protection Convention, Braunschweig, 22-26 September 2003. Secretariat of the International Plant Protection Convention, Roma, pp. 116-124.
- Rooney, D.C., Hutchens, E., Clipson, N., Baldini, J., McDermott, F. 2010. Microbial community diversity of moonmilk deposits at Ballynamintra Cave, Co. Waterford, Ireland. *Microbial Ecology* 60: 753-761.
- Rouf, M.A., Stokes, J.L. 1964. Morphology, nutrition and physiology of *Sphaerotilus discophorus*. *Archiv fur Mikrobiologie* 49: 132-149.
- Rushforth, S.R., Kaczmarzka, I., Johansen, J.R. 1984. The subaerial diatom flora of Thurston Lava Tube, Hawai'i. *Bacillaria* 7: 135-157.
- Sahin, N., Veyisoglu, A., Tatar, D., Sproer, C., Cetin, D., Guven, K., Klenk, H.P. 2014. *Pseudonocardia cypriaca* sp. nov., *Pseudonocardia salamisensis* sp. nov., *Pseudonocardia hierapolitana* sp. nov. and *Pseudonocardia kujensis* sp. nov.,

- isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 1703-1711.
- Sahl, J.W., Schmidt, R., Swanner, E.D., Mandernack, K.W., Templeton, A.S., Kieft, T.L., Smith, R.L., Sanford, W.E., Callaghan, R.L., Mitton, J.B., Spear, J.R. 2008. Subsurface microbial diversity in deep-granitic-fracture water in Colorado. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 143-152.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-426.
- Saiz-Jimenez, C. 2012. Microbiological and environmental issues in show caves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 2453-2464.
- Saiz-Jimenez, C., Miller, A.Z., Martin-Sanchez, P.M., Hernandez-Marine, M. 2012. Uncovering the origin of the black stains in Lascaux Cave in France. *Environmental Microbiology* 14: 3220-3231.
- Sallstedt, T., Ivarsson, M., Lundberg, J., Sjöberg, R., Vidal Romaní, J.R. 2014. Speleothem and biofilm formation in a granite/dolerite cave, Northern Sweden. *International Journal of Speleology* 43: 305-313.
- Sanchez-Moral, S., Cañaveras, J.C., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C., Bedoya, J., Luque, L. 2003. Biomediated precipitation of calcium carbonate metastable phases in hypogean environments: a short review. *Geomicrobiology Journal* 20: 491-500.
- Sand, W. 1997. Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates – a general mechanistic review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 40: 183-190.
- Santamaria, M., Fosso, B., Consiglio, A., De Caro, G., Grillo, G., Licciulli, F., Liuni, S., Marzano, M., Alonso-Aleman, D., Valiente, G., Pesole, G. 2012. Reference databases for taxonomic assignment in metagenomics. *Briefings in Bioinformatics* 13: 682-695.
- Santamarta Cerezal, J.C., Suárez Moreno, F. 2015. Minas y galerías de agua para la captación de aguas subterráneas en las Islas Canarias. *Ingeopres: Actualidad Técnica de Ingeniería Civil, Minería, Geología y Medio Ambiente* 243: 26-29.
- Santana Ramírez, J.I., Suárez Alejandro, P. 2008. Heredamientos de aguas de la Vega Mayor de Telde. Heredamiento de aguas del Valle de los Nueve. En: Navarro García, E. (Ed.). *Heredamientos de Aguas de Canarias*. Excelentísimo Ayuntamiento de Arucas, Arucas, pp. 81-102.
- Santelli, C.M., Pfister, D., Lazarus, D., Sun, L., Burgos, W.D., Hansel, C.M. 2010. Promotion of Mn(II) oxidation and remediation of coalmine drainage in passive

- treatment systems by diverse fungal and bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 4871-4875.
- Santelli, C.M., Webb, S.M., Dohnalkova, A.C., Hansel, C.M. 2011. Diversity of Mn oxides produced by Mn(II)-oxidizing fungi. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75: 2762-2776.
- Sanz-Rubio, E., Sanchez-Malo, A., Fernandez-Cortes, A., Garcia-Anton E., Sanchez-Moral, S., Cuezva, S., Miller, A.Z., Dionisio, A., Afonso, M.J., Chaminé, H.I., Hermosin, B., Saiz-Jimenez, C. 2013. Microclimatic studies in Paranhos water galleries, Porto (Portugal). En: Rogerio-Candelera, M.A., Lazzari, M., Cano, E. (Eds.). *Science and Technology for the Conservation of Cultural Heritage*. CRC Press/Balkema, Leiden, pp. 25-28.
- Saratovsky, I., Wightman, P.G., Pasten, P.A., Gaillard, J.F., Poeppelmeier, K.R. 2006. Manganese oxides: parallels between abiotic and biotic structures. *Journal of the American Chemical Society* 128: 11188-11198.
- Saratovsky, I., Gurr, S., Hayward, M. 2009. The structure of manganese oxide formed by the fungus *Acremonium* sp. Strain KR21–2. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 73: 3291-3300.
- Schabereiter-Gurtner, C., Saiz-Jimenez, C., Piñar, G., Lubitz, W., Rölleke, S. 2004. Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonin and La Garma). *FEMS Microbiology Ecology* 47: 235-247.
- Schloss, P., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F. 2009. Introducing Mothur: Open source, platform-independent, communitysupported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7537-7541.
- Schulte, f., Brzezinka, K.W., Lutzenberger, K., Stege, H., Panne, U. 2008. Raman spectroscopy of synthetic organic pigments used in 20th century works of art. *Journal of Raman Spectroscopy* 39: 1455-1463.
- Šebela, S., Miler, M., Skobe, S., Torkar, S., Zupancic, N. 2015. Characterization of black deposits in karst caves, examples from Slovenia. *Facies* 61: 6.
- Shopov, Y.Y., Hill, C.A. 1997. Laboratory Techniques. En: Hill, C.A., Forti, P. (Eds.). *Cave Minerals of the World. Second Edition*. National Speleological Society. Huntsville, pp. 291-293.

- Siering, P.L., Ghiorse, W.C. 1997. PCR detection of a putative manganese oxidation gene (mofA) in environmental samples and assessment of mofA gene homology among diverse manganese-oxidizing bacteria. *Geomicrobiology Journal* 14: 109-125.
- Simkiss, K., Wilbur, K.M. 1989. Biomineralization. Cell Biology and Mineral Deposition. Academic Press, San Diego.
- Simon, K.S., Pipan, T., Culver, D.C. 2007. A conceptual model of the flow and distribution of organic carbon in caves. *Journal of Cave and Karst Studies* 69: 279-284.
- Sly, L.I., Arunpairojana, V., Hodgkinson, M.C. 1988. *Pedomicrobium manganicum* from drinking-water distribution systems with manganese-related "dirty water" problems. *Systematic and Applied Microbiology* 11: 75-84.
- Sly, L.I., Hodgkinson, M.C.H., Arunpairojana, V. 1990. Deposition of manganese in a drinking water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 628-639.
- Snider, J.R., Moya, M., Garcia, M.G., Spilde, M.N., Northup, D.E. 2009. Identification of the microbial communities associated with roots in lava tubes in New Mexico and Hawai'i. *Proceedings of the 15th International Congress of Speleology*. 19-26 July 2009, Kerrville, Texas, 2: 718-723.
- Snider, J.R. 2010. Comparison of Microbial Communities on Roots, Ceilings and Floors of Two Lava Tube Caves in New Mexico. MS Thesis. University of New Mexico, New Mexico.
- Sopeña, F., Laiz, L., Morillo, E., Sanchez-Trujillo, M.A., Villaverde, J., Jurado, V., Saiz-Jimenez, C. 2014. Phenanthrene biodegradation by *Pseudomonas xanthomarina* isolated from an aged contaminated soil. *Clean – Soil, Air, Water* 42: 785-790.
- Spilde, M.N., Northup, D., Boston, P.J., Schelble, R.T., Dano, K.E., Crossey, L.J., Dahm, C.N. 2005. Geomicrobiology of cave ferromanganese deposits: a field and laboratory investigation. *Geomicrobiology Journal* 22: 99-116.
- Spring, S., Kämpfer, P., Ludwig, W., Schleifer, K.H. 1996. Polyphasic characterization of the genus *Leptothrix*: new descriptions of *Leptothrix mobilis* sp. nov. and *Leptothrix discophora* sp. nov. nom. rev. and emended description of *Leptothrix cholodnii* emend. *Systematic and Applied Microbiology* 19: 634-643.
- Spring, S., Kämpfer, P. 2006. Genus Incertae Sedis XIII. *Leptothrix*. En: Brenner, D.J., Krieg, N.R. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second edition,

- Volume Two: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- and Epsilonproteobacteria. Springer Science & Business Media, Nueva York, pp. 740-746.
- Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L., Painter, P.R. 1992. Microbiología. Segunda Edición. Editorial Reverté, Barcelona, pp. 345-346.
- Staley, J.T., Crawford, R. 1975. The biologist's chamber: lava tube slime. *Cascade Caver* 14: 20-21.
- Sterflinger, K., Piñar, G. 2013. Microbial deterioration of cultural heritage and works of art - tilting at windmills? *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 9637-9646.
- Steward, P.S., Franklin, M.J. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 6: 199-210.
- Stomeo, F., Portillo, M.C., Gonzalez, J.M., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C. 2008. *Pseudonocardia* in white colonizations in two caves with Paleolithic paintings. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62: 483-486.
- Stoner, M.F., Howarth, F.G. 1981. Community structure and niche differentiation in Hawaiian lava tubes. En: Mueller Dombois, D., Bridges, K.W., Carson, H.L. (Eds.). *Island Ecosystems: Biological organization in selected Hawaiian communities*. Hutchinson Ross Publishing Company, Stroudsburg, pp. 318-336.
- Stott, M.B., Crowe, M.A., Mountain, B.W., Smirnova, A.V., Hou, S.B., Alam, M., Dunfield, P.F. 2008. Isolation of novel bacteria, including a candidate division, from geothermal soils in New Zealand. *Environmental Microbiology* 10: 2030-2041.
- Suárez Moreno, F. 2002. Las minas de agua en Canaria. En: Palerm, J. (Ed.). *Antología sobre Pequeño Riego, Vol. III, Sistemas de Riego no Convencionales*. Colegio de Posgraduados Universidad de México, México, pp. 291-331.
- Sunda, W.G., Kieber, D.J. 1994. Oxidation of humic substances by manganese oxides yields low-molecular-weight organic substrates. *Nature* 367: 62-64.
- Suzuki, T., Ishihara, H., Toyoda, K., Shiraishi, T., Kunoh, H., Takada, J. 2013. Autolysis of Bacterial Cells Leads to Formation of Empty Sheaths by *Leptothrix* spp. *Minerals* 3: 247-257.
- Takashima, C., Kano, A., Naganuma, T., Tazaki, K. 2008. Laminated iron texture by iron-oxidizing bacteria in a calcite travertine. *Geomicrobiology Journal* 25: 193-202.

- Takeuchi, M., Katayama, T., Yamagishi, T., Hanada, S., Tamaki, H., Kamagata, Y., Oshima, K., Hattori, M., Marumo, K., Nedachi, M., Maeda, H., Suwa, Y., Sakata, S. 2014. *Methyloceanibacter caenitepidi* gen. nov., sp. nov., a facultatively methylotrophic bacterium isolated from marine sediments near a hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 462-468.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tani, Y., Miyata, N., Ohashi, M., Ohnuki, T., Seyama, H., Iwahori, K., Somaet, M. 2004a. Interaction of inorganic arsenic with biogenic manganese oxide produced by a Mn-oxidizing fungus, strain KR21-2. *Environmental Science & Technology* 38: 6618-6624.
- Tani, Y., Ohashi, M., Miyata, N., Seyama, H., Iwahori, K., Soma, M. 2004b. Sorption of Co(II), Ni(II), and Zn(II) on biogenic manganese oxides produced by a Mn-oxidizing fungus, strain KR21-2. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 39: 2641-2660.
- Tanner, M.A., Goebel, B.M., Dojka, M.A., Pace, N.R. 1998. Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3110-3113.
- Tazaki, K. 2006. Clays, microorganisms, and biomineralization. En: Bergaya, F., Theng, B.K.G., Lagaly, G. (Eds.). *Handbook of Clay Science*. Elsevier, Amsterdam, pp. 477-497.
- Teare, J.M., Islam, R., Flanagan, R., Gallagher, S., Davies, M.G., Grabau, C. 1997. Measurement of nucleic acid concentrations using the DyNA Quant and the GeneQuant. *Biotechniques* 22: 1170-1174.
- Tebo, B.M., Ghiorse, W.C., van Waasbergen, L.G., Siering, P.L., Caspi, R. 1997. Bacterially mediated mineral formation: insights into manganese(II) oxidation from molecular genetic and biochemical studies. *Reviews in Mineralogy* 35: 225-266.
- Tebo, B.M., Bargar, J.R., Clement, B.G., Dick, G.J., Murray, K.J., Parker, D., Verity, R., Webb, S.M. 2004. Biogenic manganese oxides: properties and mechanisms of formation. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 32: 287-328.
- Tebo, B.M., Johnson, H.A., McCarthy, J.K., Templeton, A.S. 2005. Geomicrobiology of manganese(II) oxidation. *Trends in Microbiology* 13: 421-428.

- Tomczyk-Żak, K., Kaczanowski, S., Drewniak, L., Dmoch, L., Sklodowska, A., Zielenkiewicz, U. 2013. Bacteria diversity and arsenic mobilization in rock biofilm from an ancient gold and arsenic mine. *Science of the Total Environment* 461-462: 330-340.
- Toner, B., Fakra, S., Villalobos, M., Warwick, T., Sposito, G. 2005. Spatially resolved characterization of biogenic manganese oxide production with a bacterial biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1300-1310.
- Trigo, J.F.C., Chaminé, H.I., Afonso, M.J., Almeida, H., Lopes, M.E., Teixeira, J., Pereira, R., Pinheiro, R., Meixedo, J.P., Gomes, A., Teixeira, J.F.A., Dias Costa, M.J. 2012. A Antiga Mina de Volfrâmio das Avelas (Mosteiro de Tibães, NW Portugal): Estudos Interdisciplinares para a Valorização do Património Geomineiro. *Boletim de Minas*, 47: 139-156.
- Trigo, J.F.C., Chaminé, H.I., Afonso, M.J., Almeida, H., Lopes, M.E., Teixeira, J., Pereira, R., Pinheiro, R., Meixedo, J.P., Gomes, A., Teixeira, J.F.A., Dias Costa, M.J. 2013. Valorização do Património Geológico-Mineiro: a antiga Mina das Avelas (Mosteiro de Tibães). *Ingenium* 137: 78-81.
- Urbani, P.F. 1976. Ópalo, calcedonia y calcita en la cueva del Cerro Autana (Am. 11), Territorio Federal Amazonas, Venezuela. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Espeleología* 7: 129-145.
- Urbani, F. 1996. Study of opal speleothems with scanning electron microscopy. *Revista - Facultad de Ingeniería, Universidad Central de Venezuela* 11: 69-73.
- Urbani, F., Compère, P., Willems, L. 2005. Opal-a speleothems of Wei-Assipu-Tepui, Roraima Province, Brazil. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Espeleología* 39: 21-26.
- Van, Q.N., Duc, T.T., Van, H.D. 2010. Landscapes and ecosystems of tropical limestone: Case study of the Cat Ba Islands, Vietnam. *Journal of Ecology and Field Biology* 33: 23-36.
- Van Veen, W.L., Mulder, E.G., Deinema, M.H. 1978. The *Sphaerotilus-Leptothrix* Group of Bacteria. *Microbiological Reviews* 42: 329-356.
- Vandamme, P., Coenye, T. 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2285-2289.
- Vaughan, M.J., Maier, R.M., Pryor, B.M. 2011. Fungal communities on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, Arizona, USA. *International Journal of Speleology* 40: 65-77.

Bibliografía

- Veni, G. 2002. Revising the karst map of the United States. *Journal of Cave and Karst Studies* 64: 45-50.
- Verrecchia, E.P., Verrecchia, K.E. 1994. Needle Fiber calcite: a critical review and a proposed classification. *Journal of Sedimentary Research* 64: 650-664.
- Vidal Romani, J.R., Sanjurjo Sánchez, J., Vaquero Rodríguez, M., Fernández Mosquera, D. 2010a. Speleothem development and biological activity in granite cavities. *Géomorphologie* 4: 337-346.
- Vidal Romani, J.R., Sanjurjo Sánchez, J., Vaquero, M., Fernández Mosquera, D. 2010b. Speleothems of granite caves. *Comunicações Geológicas* 97: 71-80.
- Vilar, A. 1998. O volfrâmio de Arouca no contexto da segunda guerra mundial (1939-1945). Edição Câmara Municipal de Arouca.
- Villalobos, M., Toner, B., Bargar, J., Sposito, G. 2003. Characterization of the manganese oxide produced by *Pseudomonas putida* strain MnB1. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67: 2649-2662.
- Villalobos, M., Bargar, J., Sposito, G. 2005. Trace metal retention on biogenic manganese oxide nanoparticles. *Elements* 1: 223-226.
- Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345: 63-65.
- Webb, J.A., Finlayson, B.L. 1987. Incorporation of Al, Mg, and water in opal-A: Evidence from speleothems. *American Mineralogist* 72: 1204-1210.
- Webb, S.M., Tebo, B.M., Bargar, J.R. 2005a. Structural characterization of biogenic Mn oxides produced in seawater by the marine *Bacillus* sp. strain SG-1. *American Mineralogist* 90: 1342-1357.
- Webb, S.M., Dick, G.J., Bargar, J.R., Tebo, B.M., Fridovich, I., 2005b. Evidence for the presence of Mn(III) intermediates in the bacterial oxidation of Mn(II). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 5558-5563.
- Weiner, S., Dove, P.M. 2003. An overview of biomineralization and the problem of the vital effect. En: Dove, P.M., Weiner, S., De Yoreo, J.J. (Eds.). *Biomineralization*. Mineralogical Society of America, Washington, vol. 54, pp. 1-31.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Went, F.W. 1969. Fungi associated with stalactite growth. *Science* 166: 385-386.

- West, J.M., Christofi, N., McKinley, I.G. 1985. An overview of recent microbiological research relevant to the geological disposal of nuclear waste. *Radioactive Waste Management and the Nuclear Fuel Cycle* 6: 79-95.
- White, W.D., Jefferson, G.L., Hanan, J.F. 1966. Quartzite karst in southeastern Venezuela. *International Journal of Speleology* 2: 309-314.
- White, W.B. 1984. Rate processes: chemical kinetic and karst landform development. En: LaFleur, R.G. (Ed.). *Groundwater as a Geomorphic Agent*. Allen and Unwin, Londres, pp. 227-248.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.). *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Nueva York, pp. 315-322.
- White, W.B. 1997. Color of Speleothems. En: Hill, C.A., Forti, P. (Eds.). *Cave Minerals of the World, Second Edition*. National Speleological Society, Huntsville, pp. 239-244.
- White, W.B. 2010. Secondary minerals in volcanic caves: data from Hawai'i. *Journal of Cave and Karst Studies* 72: 75-85.
- Wilkinson, H.P. 2003. Fossil actinomycete filaments and fungal hyphae in dicotyledonuous wood from the Eocene London Clay, Isle-of-Sheppey, Kent, England. *Botanical Journal of the Linnean Society* 142: 383-394.
- Willems, L., Compère, Ph., Hatert, F., Pouclet, A., Vicat, J.P., Ek, C., Boulvain, F. 2002. Karst in granitic rocks, South Cameroon: Cave genesis and silica and taranakite speleothems. *Terra Nova* 14: 355-362.
- Woo, K.S., Choi, D.W., Lee, K.C. 2008. Silicification of cave corals from some lava tube caves in the Jeju Island, Korea: implications for speleogenesis and a proxy for paleoenvironmental change during the Late Quaternary. *Quaternary International* 176-177: 82-95.
- Worboys, G., Davey, A., Stiff, C. 1982. Report on cave classification. *Cave Management in Australia IV*: 11-18.
- Wray, R.A.L. 1999. Opal and chalcedony speleothems on quartz sandstones in the Sydney region, southeastern Australia. *Australian Journal of Earth Sciences* 46: 623-632.
- Wright, D.T. 1999. The role of sulphate-reducing bacteria and cyanobacteria in dolomite formation in distal ephemeral lakes of the Coorong region, South Australia. *Sedimentary Geology* 126: 147-157.

- Yashiro, E., Spear, R.N., McManus, P.S. 2011. Culture-dependent and culture-independent assessment of bacteria in the apple phyllosphere. *Journal of Applied Microbiology* 110: 1284-1296.
- Zaitsev, G.M., Tsitko, I.V., Rainey, F.A., Trotsenko, Y.A., Uotila, J.S., Stackebrandt, E., Salkinoja-Salonen, M.S. 1998. New aerobic ammonium-dependent obligately oxalotrophic bacteria: description of *Ammoniphilus oxalaticus* gen. nov., sp. nov. and *Ammoniphilus oxalivorans* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 151-163.
- Zeng, Y., Baumbach, J., Barbosa, E.G., Azevedo, V., Zhang, C., Koblížek, M. 2016. Metagenomic evidence for the presence of phototrophic Gemmatimonadetes bacteria in diverse environments. *Environmental Microbiology Reports* 8: 139-149.
- Zhang, H.H., Chen, S.N., Huang T.L., Ma, W.X., Xu, J.L., Sun, Xi. 2015. Vertical distribution of bacterial community diversity and water quality during the reservoir thermal stratification. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12: 6933-6945.
- Zhou, J., Gu, Y., Zou, C., Mo, M. 2007. Phylogenetic diversity of bacteria in an earth-cave in Guizhou province, southwest of China. *Journal of Microbiology* 45: 105-112.
- Ziegler, S., Ackerman, S., Majzlan, J., Gescher, J. 2009. Matrix composition and community structure analysis of a novel bacterial pyrite leaching community. *Environmental Microbiology* 11: 2329-2338.
- Ziegler, S., Dolch, K., Geiger, K., Krause, S., Asskamp, M., Eusterhues, K., Kriews, M., Wilhelms-Dick, D., Goettlicher, J., Majzlan, J., Gescher, J. 2013. Oxygen-dependent niche formation of a pyrite-dependent acidophilic consortium built by archaea and bacteria. *The ISME Journal* 7: 1725-1737.
- Zijinge, V., Welling, G.W., Degener, J.E., Winkelhoff, A.J., Abbas, F., Harmsen, H.J.M. 2006. Denaturing gradient gel electrophoresis as a diagnostic tool in periodontal microbiology. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 3628-3633.
- Zimmermann, J., Gonzalez, J.M., Ludwig, W., Saiz-Jimenez, C. 2005. Detection and phylogenetic relationships of a highly diverse uncultured acidobacterial community on paleolithic paintings in Altamira Cave using 23S rRNA sequence analyses. *Geomicrobiology Journal* 22: 379-388.